

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS
DES APOPROTEINS VON PHYCOCYANIN
AUS CYANIDIUM CALDARIUM

Angelika Schuster

1982

**Untersuchungen zum Nachweis
des Apoproteins von Phycocyanin**

aus *Cyanidium caldarium*

Dissertation

der

Fakultät für Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

Angelika Schuster

aus München

Oktober 1982



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger
2. Berichterstatter: Dr. habil. H.-P. Köst

Tag der mündlichen Prüfung: 1.12.1982

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger danke ich herzlich für die Unterstützung dieser Arbeit durch wertvolle Hinweise und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch

Herrn Dr. habil. H.-P. Köst für sein Interesse und viele hilfreiche Ratschläge sowie die Überlassung von ^{14}C -Biliverdindimethylester,

Herrn Dr. J. Eder und seinen Mitarbeitern vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried für die Bereitstellung und Pflege der Kaninchen sowie für seine Mithilfe bei der Antiserumgewinnung,

Herrn Dr. S.B. Brown für die Synthese von ^{14}C -Haminchlorid sowie Herrn A. Holroyd für die Mithilfe bei den ^{14}C -Einbauversuchen,

allen Freunden und Kollegen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite:
A. <u>Einleitung</u>	1
I. Theoretischer Teil	1
1. Vorkommen der Biliproteide	1
2. Lokalisation und Funktion	2
3. Chemische Natur	4
4. Biosynthese	6
5. Immunologie	11
II. Aufgaben- und Problemstellung	13
B. <u>Ergebnisse und Diskussion</u>	14
1. Taxonomie der einzelligen Alge Cyanidium caldarium	14
2. Anzucht und Wachstum der Algen	15
3. Ernte und Aufschluß der Algenzellen	16
4. Gewinnung des Anti-PC-Antiserums	17
5. Untersuchungen an Rohextrakten aus Cyanidium caldarium	18
5.1 Proteingehalt der Rohextrakte und Ein- fluß von Glucose auf die PC-Synthese	18
5.2 Ultradünnschicht-Isoelektrische Fokussierung	20
5.3 Immunfixierung	23
5.4 Ouchterlony-Doppeldiffusions-Test	24
5.5 SDS-Elektrophorese der Immunpräzipitate aus den Rohextrakten	28
5.6 Schlußfolgerungen	31

	Seite:
6. Spezifische Hemmung der Phycocyano- bilin-Synthese	33
6.1 Einfluß von Lävulinsäure auf die Chromophorsynthese	33
6.2 Inkubation der Algenzellen mit Lävulinsäure	34
6.3 PC-Gehalt in Rohextrakten aus LA-behandelten Algen	35
6.4 Quantitative Präzipitation	37
6.5 Chromophor-Protein-Verhältnis in Immunpräzipitaten	39
6.6 Ouchterlony-Doppeldiffusion	41
6.7 SDS-Elektrophorese der Immunpräzipitate	42
7. Radioaktive Markierung mit ^3H -Leucin	45
7.1 Versuche zur Aufnahme von ^3H -Leucin durch die Algenzellen	46
7.2 Inkubation mit Lävulinsäure und ^3H -Leucin	48
7.3 Schlußfolgerungen	
8. Einbau von ^{14}C -Häm als Chromophorvorstufe	55
9. Auftrennung eines Rohextraktes aus LA-behandelten Algen über DEAE-Cellulose	63
10. Versuch der Bindung von PCB-Chromophor an F2-Protein	68
11. Versuche zur Charakterisierung von F2	74
11.1 Immunfixierung	74
11.2 Zweidimensionale Immunelektrophorese	75
11.3 Präparative isoelektrische Fokussierung	78
C. <u>Zusammenfassung</u>	82

	Seite:
E. <u>Experimenteller Teil</u>	86
1. Anzucht der Algen	86
1.1 Nährmedium	86
1.2 Kulturbedingungen	87
1.2.1 Anzucht mit Lävulinsäure	87
1.2.2 Anzucht mit ^3H -Leucin	88
1.3 Bestimmung der Zellzahl	88
2. Ernte der Algen	88
3. Herstellung der Rohextrakte	89
4. Anti-Phycocyanin-Antiserum	89
4.1 Immunisierung der Kaninchen	89
4.2 Gewinnung des Serums	89
5. Immunchemische Methoden	90
5.1 Ouchterlony-Doppeldiffusion	90
5.2 Immunfixierung	90
5.3 Zweidimensionale Immunelektrophorese	91
5.3.1 Herstellung der antikörperhaltigen Agarosegele	91
5.3.2 1. Dimension	92
5.3.2.1 Elektrophorese	92
5.3.2.2 Isoelektrische Fokussierung	93
5.3.3 2. Dimension	93
5.3.4 Tandem-Technik	94
5.4 Immunpräzipitation in vitro	95
5.5 Bestimmung des Chromophor-Protein- Verhältnisses in Immunpräzipitaten	95
6. Ultradünnschicht-Isoelektrische Fokussierung	96
6.1 Gießen der Polyacrylamidgele	96
6.2 Zusammensetzung der Lösungen	96

	Seite:
6.3 Durchführung der isoelektrischen Fokussierung	97
6.4 Färben und Aufbewahren der Gele	98
7. Präparative isoelektrische Fokussierung	98
8. Proteinbestimmung	99
9. SDS-Elektrophorese im Polyacrylamid-Gradientengel	101
9.1 Gießen der Gradientengele	101
9.1.1 Trenngel-Lösungen	101
9.1.2 Sammelgel-Lösung	102
9.2 Vorbereiten der Proben	104
9.3 Probenauftrag	104
9.4 Elektrophorese	105
9.5 Färben und Fixieren der Gele	105
10. Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung nach Auftrennung von Immunpräzipitaten im SDS-Gradientengel	106
10.1 Elution in Szintillationsflüssigkeit	106
10.2 Fluorographie	107
11. Versuch mit ^{14}C -Häm als Chromophorvorstufe	107
11.1 Bestimmung des Chromophorgehalts	108
12. Versuch mit Biliverdin als Chromophorvorstufe	110
13. Abspaltung des Phycocyanobilin-Chromophors	110
13.1 mit HBr	110
13.2 mit kochendem Methanol	111
14. Bestimmung der spezifischen Aktivität von ^{14}C -Häminchlorid	111
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	113

Verzeichnis der Abkürzungen

ALA	δ -Aminolävulinsäure
BSA	Rinderserum-Albumin
Ci	Curie
cpm	counts/minute (gezählte Zerfälle)
d	dalton
DEAE	Diethylaminoethan
dpm	decays/minute (tatsächliche Zerfälle)
E	Extinktion
F2	immunaktive Fraktion nach Auftrennung über DEAE-Cellulose (0.11 - 0.17 M KCl)
Hämdme	Hämdimethylester
IEP	Isoelektrischer Punkt
kD	Kilodalton
LA	Lävulinsäure
NaPP	Natriumphosphatpuffer
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PC	Phycocyanin
PCB(dme)	Phycocyanobilin(dimethylester)
RE - LA	Rohextrakte aus unbehandelten Algen nach 72 h Belichtung
RE + LA	Rohextrakte aus LA-behandelten Algen nach 72 h Belichtung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

A. E i n l e i t u n g

I. Theoretischer Teil

1. Vorkommen der Biliproteide

Die Biliproteide Phycoerythrin (rot), Phycocyanin (blau) und Allophycocyanin (blaugrün) kommen bei Blaualgen (Cyanobakterien), Rotalgen (Rhodophyceen) und Cryptophyceen vor und werden dementsprechend auch als Phycobiliproteide bezeichnet (Übersicht in: Rüdiger, 1975; O'Carra und O'hEocha, 1976; Glazer, 1977).

Bei Blau- und Rotalgen unterscheidet man je nach Herkunft und spektralen Eigenschaften C-, R- und B-Phycoerythrin (rote Chromophore) sowie C- und R-Phycocyanin (blaue Chromophore). Zudem existieren auch Biliproteide, die sowohl blaue als auch rote Chromophore enthalten (Phycoerythrocyanin: Bryant et al., 1976). Allophycocyanin (4 spektrale Typen: Gantt, 1981) ist in Rot- und Blaualgen immer, wenn auch nur in geringen Mengen, vorhanden, während Phycocyanin (alle Blaualgen) und Phycoerythrin (fehlt in manchen Algen ganz) in derart beträchtlichen Mengen vorkommen, daß sie die Farbe der Algen bestimmen und so zu deren Namensgebung und Einteilung beigetragen haben. Der Gehalt an Phycobiliproteiden kann bis zu 60 % des löslichen Proteins und 25 % des Trockengewichts in Cyanophyceen ausmachen (Troxler et al., 1979).

2. Lokalisation und Funktion

Bei den bisher untersuchten Cryptophyceen sind die Phycobiliproteide diffus im intrathylakoidalen Raum lokalisiert (Gantt, 1979). Im Gegensatz dazu finden sich bei den Rhodophyceen und Cyanobakterien die Phycobiliproteide in diskreten morphologischen Einheiten, den Phycobilisomen, zusammengefaßt (Gantt, 1981, Review; MacColl, 1982, Review). Diese Partikel ($\phi \sim 40$ nm) sitzen in Reihen angeordnet der dem Stroma zugewandten Oberfläche der Thylakoidmembran auf (Wehrmeyer, 1971; Wanner und Köst, 1980) und konnten isoliert werden (Gantt und Lipschultz, 1972; Gray et al., 1973; Nies und Wehrmeyer, 1980).

Viele Cyanobakterien und Rotalgen besitzen Phycobilisomen vom hemi-discoidalen Typ (Mörschel et al., 1977), außerdem kommen in einigen Rotalgen ellipsoide Phycobilisomen vor (Gantt, 1981). In den hemi-discoidalen Phycobilisomen sind die Biliproteide Phycoerythrin (bzw. Phycoerythrocyanin) und Phycocyanin in sechs stäbchenförmigen Aggregaten um das zentrale Allophycocyanin angeordnet (Nies und Wehrmeyer, 1981).

Der Aufbau der Phycobilisomen steht in direktem Zusammenhang mit der Funktion der Phycobiliproteide als akzessorische Pigmente der Photosynthese. In einem strahlungslosen Energietransfer wird die eingefangene Lichtenergie von Phycoerythrin (oder Phycoerythrocyanin) über Phycocyanin und Allophycocyanin auf das Chl. *a* des Photosystems II übertragen (Haxo und Blinks, 1950; Goedheer, 1965; Porter et al., 1978; Grabowski und Gantt, 1978). Die Effektivität beträgt dabei zwischen 90 und 99 % (Searle et al., 1978; Fisher et al., 1980). Daneben wurde auch die Fähigkeit der Phycobiliproteine, Photosystem I zu aktivieren, bereits mehrfach gezeigt (Gantt, 1977; Peterson et al., 1981 und Referenzen). Diese Aktivierung des Photosystems I ist möglicherweise auch die Erklärung für die Funktion von

Phycocyanin als Hauptphotorezeptor bei der lichtabhängigen Keimung von *Anabaena akinetes* (Braune, 1979).

In den Phycobilisomen sind außer den genannten Biliproteinen weitere Polypeptide gefunden worden. So beschrieben Yamanaka et al. (1980) für *Synechococcus* fünf farblose Polypeptide mit Molekulargewichten von 75, 45, 33, 30 und 27 kD, von denen die drei kleineren mit Phycocyanin Komplexe bilden (Lundell et al., 1981 a; Yu und Glazer, 1982 für *Anabaena variabilis*). Weitere Untersuchungen ergaben, daß das 75 kD-Polypeptid entgegen der früheren Befunde nicht farblos ist, sondern einen Chromophor trägt (höchstwahrscheinlich Phycocyanobilin (Abb.1) oder sehr ähnlich), der bisher durch Aufarbeitungsartefakte ausgeblichen war (Lundell et al., 1981 b). Möglicherweise dient dieses Peptid nach Allophycocyanin als terminaler Energieakzeptor in Phycobilisomen. Redlinger und Gantt (1981) fanden in *Porphyridium cruentum*-Phycobilisomen ein vergleichbares Polypeptid mit 95 kD.

Die farblosen Polypeptide machen 10 - 15 % der Phycobilisomen-Proteine aus. Ihre Funktion besteht im Zusammenhalt der Phycobiliproteine untereinander ("linker polypeptides", Yamanaka und Glazer, 1980; Yu und Glazer, 1982; Glick und Zilinskas, 1982) und vermutlich sind sie auch für die Verankerung der Phycobilisomen in der Thylakoidmembran verantwortlich (Tandeau de Marsac und Cohen-Bazire, 1977; Bryant und Cohen-Bazire, 1981; Offner et al., 1981).

Die Phycobiliproteine schließen die Absorptionslücke des Chlorophylls und ermöglichen so eine physiologische Anpassung der Algen an besondere ökologische Verhältnisse, wie sie z.B. tiefere Wasserschichten darstellen, in denen Chlorophyll allein nicht mehr genug Lichtenergie absorbiert, da ein beträchtlicher Anteil des Rotlichts nicht mehr dorthin gelangt. Zusätzlich kann sich die Konzentration an photosynthetisch aktiven Pigmenten mit zunehmender Wassertiefe erhöhen (Ramus et al., 1976).

Bemerkenswert ist im Rahmen der Funktion der Biliproteine vielleicht die Tatsache, daß in jüngster Zeit Phycocyanin sogar als Farbstoff für Lebensmittel eingesetzt wurde (Rotte & Co. Ltd., Patent, 1980; Baylon, 1981).

3. Chemische Natur

Biliproteide sind Proteinkomplexe von Gallenfarbstoffen mit kovalenter Bindung des Farbstoffs an das Protein (Rüdiger, 1971). Der Proteinanteil der meisten Biliproteide besteht aus zwei verschiedenen Polypeptid-Untereinheiten in einem 1 : 1 - Verhältnis (Bennett und Bogorad, 1971; Glazer und Cohen-Bazire, 1971), einer leichteren α -Kette (10 - 20 kD) und einer schwereren β -Kette (14 - 23 kD) (Bogorad, 1975), wobei die C-Phycocyanine einen Chromophor auf α und zwei auf β besitzen (Glazer und Fang, 1973), die C-Phycoerythrine zwei auf α und drei bis vier auf β (Muckle und Rüdiger, 1977). Allophycocyanine tragen auf jeder Untereinheit einen Chromophor. Die monomeren Proteinuntereinheiten können je nach Konzentration, Ionenstärke und pH größere Aggregate bilden (Hattori et al., 1965; Berns, 1971), wobei offensichtlich die Hexamere (C-Phycocyanin und C-Phycoerythrin $\alpha_6\beta_6$, B-Phycoerythrin $\alpha_6\beta_6\gamma$) die funktionell wichtigen in-vivo-Aggregate darstellen (Mörschel et al., 1980; Fisher et al., 1980; Troxler et al., 1981).

Mit der Aminosäuresequenz der α - und β -Untereinheit des Phycocyanins von *Cyanidium caldarium* ist die erste komplette Aminosäuresequenz eines Phycobiliproteins einer eukaryotischen Alge aufgeklärt worden (Offner et al., 1981; Troxler et al., 1981). Der Vergleich mit schon bekannten Untereinheitensequenzen zweier prokaryotischer Cyanobakterien (Freidenreich et al., 1978; Frank et al., 1978; Walsh et al., 1980) zeigt ausgeprägte Homologie zwischen den α -Untereinheiten einmal und den β -Untereinheiten zum anderen. Aber auch die Aminosäuresequenz der α - und

β -Untereinheit von *Cyanidium caldarium* weisen homologe Abschnitte auf und bestätigen damit frühere Befunde (Williams et al., 1974). Es konnte gezeigt werden, daß die β -Untereinheit eine eingeschobene Sequenz von 12 Aminosäuren besitzt. In diesem Bereich ist der zweite Chromophor gebunden.

Die Chromophore gehören als lineare offenkettige Tetrapyrrole zur Klasse der Gallenfarbstoffe (Lemberg und Bader, 1933). Das unterschiedliche Absorptionsverhalten von Phycocyanobilin (blauer Chromophor der Phycocyanine und Allophycocyanine) und Phycoerythrobilin (roter Chromophor der Phycoerythrine) entsteht durch die unterschiedliche Länge des konjugierten Doppelbindungssystems (Abb. 1a und 1b). Im Gegensatz zum Phycocyanobilin reicht beim Phycoerythrobilin die Konjugation nur bis C 14 und somit wird zur Anregung energiereicheres, kürzerwelliges Licht benötigt (PE $\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$, PC $\lambda_{\max} = 620 \text{ nm}$, Offner et al., 1981).

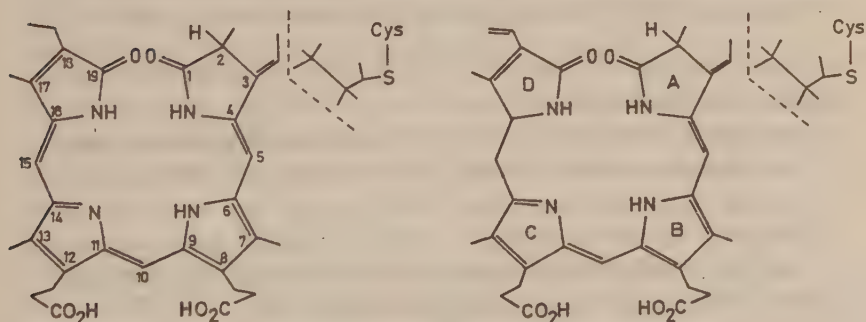


Abb. 1: a) Chromophor des Phycocyanins: Phycocyanobilin
 b) Chromophor des Phycoerythrins: Phycoerythrobilin
 Die Bindung an ein Cystein des Proteins erfolgt über eine Thioether-Bindung.

Die kovalente Bindung des Chromophors erfolgt von Ring A über eine Thioetherbindung an ein Cystein des Apoproteins. Neben den bisherigen indirekten Nachweisen (Rüdiger und O'Carra, 1969; Schoch und Rüdiger, 1976; Bryant et al., 1978; Köst-Reyes und Köst, 1979) wurde ein direkter Beweis für eine Thioetherbindung eines der Phycocyanobiline der β -Untereinheit von *Synechococcus* 6301 von Lagarias et al. (1979) erbracht. Die Frage, ob noch eine zweite kovalente Chromophor-Protein-Bindung an Ring C (oder D) existiert, konnte bisher noch nicht eindeutig beantwortet werden (Glazer et al., 1979; Kufer, 1980; Scheer, 1981).

4. Biosynthese

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es kaum Informationen über die Proteinsynthese der Biliproteide, über den Mechanismus der Chromophorbindung an das Protein und die Bildung der Phycobilisomen. Es konnte lediglich gezeigt werden, daß im Stroma der Chloroplasten keine größeren Mengen freie Phycobiliproteine auftreten (Gantt, 1981).

Für die Bildung der Chromoproteine wären prinzipiell zwei Mechanismen denkbar:

- 1) Der Chromophor wird als Cystein-Chromophor-Komplex an der entsprechenden Stelle in die wachsende Proteinkette eingebaut.
- 2) Apoprotein und Chromophor werden getrennt synthetisiert und in einem nachfolgenden Schritt erfolgt die Bindung des Chromophors zum fertigen Biliprotein.

Für die zweite Möglichkeit sprechen Versuche, die von Troxler und Lester (1967) durchgeführt wurden: bei Zugabe hoher Konzentrationen ALA ins Medium schieden *C. caldarium*-Zellen Porphyrine und Phycocyanobilin-Chromophor ins Medium ab, d.h. die Bildung von Chromophor ist von einer Synthese des Apoproteins unabhängig.

Das Molekulargewicht sämtlicher Chloroplasten-Proteine übertrifft um ein Vielfaches die Kapazität des Chloroplasten-Genoms (6×10^6 d, d.h. ca. 100 Proteine). Daraus wurde geschlossen, daß nicht alle in Chloroplasten vorkommenden Proteine vom Chloroplasten-Genom kodiert werden bzw. in den Plastiden synthetisiert werden (Ellis, 1981).

So könnte, analog dem Chlorophyll a/b - Protein-Komplex, dessen Untereinheiten an 80 S-Ribosomen im Cytosol als größere "precursor" kernkodiert synthetisiert (Kung et al., 1972; Machold und Aurich, 1972) und erst beim post-translationalen Transport (Ellis, 1981) in die Chloroplasten zur endgültigen Länge processiert werden (Schmidt et al., 1981), auch für Biliproteine ein solcher Syntheseweg diskutiert werden.

Für *Cyanidium caldarium* konnten jedoch kurz vor Abschluß dieser Arbeit Steinmüller et al. (1982) durch Translation von Poly A⁺-RNA sowie Poly A⁻-RNA in einem zellfreien Reticulocyten-System zeigen, daß die α - und β -Untereinheit von Phycocyanin Translationsprodukte der Poly A⁻-RNA sind und demnach im Chloroplasten synthetisiert werden.

Im übrigen vertreten Chua und Schmidt (1979) die Hypothese, daß die meisten Chloroplasten-Proteine im Cytosol synthetisiert und in einem ATP-abhängigen Schritt (Grossman et al., 1980) in die Chloroplasten gelangen.

Nach demselben Prinzip läuft auch die Biosynthese vieler mitochondrialer Proteine ab (Chua und Schmidt, 1979; Nelson und Schatz, 1979; Heinrich, 1980). Für Cytochrom c konnten Korb und Neupert (1978) zeigen, daß die Addition der Häm-Gruppe an Apocytochrom c mit großer Wahrscheinlichkeit nur in den Mitochondrien erfolgt und möglicherweise einen wichtigen Schritt beim Transport des Apocytochrom c durch die äußere Membran darstellt.

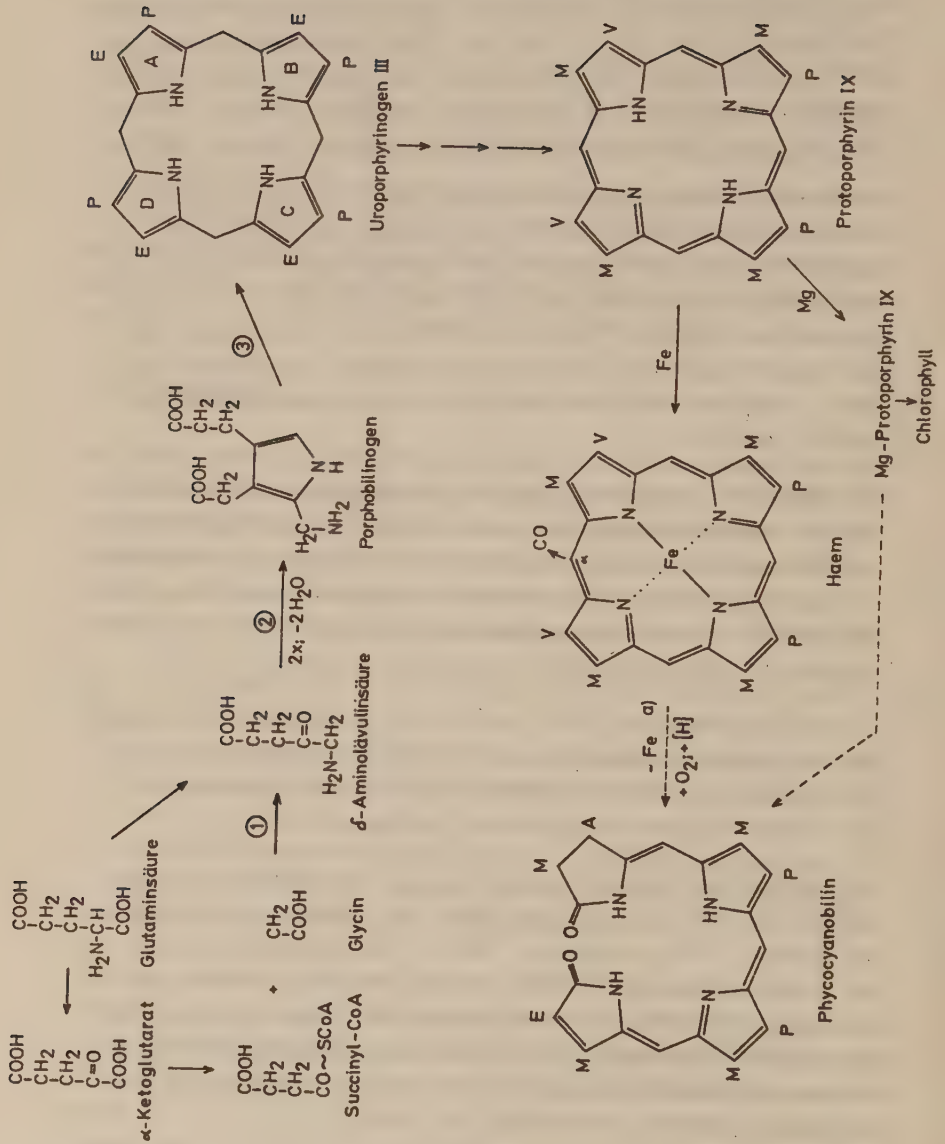


Abb. 2

Die zusätzlichen Aminosäuresequenzen am C- oder N-terminalen Ende, die bei vielen der Vorläufer-Proteine gefunden wurden, die "transit sequences" (Chua und Schmidt, 1979), dienen nach Dobberstein et al. (1977) dem spezifischen Transport in die Zellorganelle ("Signalhypothese").

Über die Biosynthese des Chromophoranteils, der aus dem Porphyrinstoffwechsel stammt, liegen weit mehr gesicherte Befunde vor. Besonders die Arbeitsgruppe um Troxler hat sich in den letzten Jahren intensiv mit diesem Gebiet befaßt (speziell mit der Phycocyanobilin-Synthese).

Troxler und Lester (1967) hatten gezeigt, daß radioaktiv markierte δ -Aminolävulinsäure (ALA) in Phycocyanobilin und Phycoerythrobilin aus Rotalgen eingebaut worden war, nachdem bereits bekannt war, daß ALA die Vorstufe für Häm in tierischen Organismen (Shemin und Russell, 1953) und Bakterien (Lascelles und Altshuler, 1967) und für Chlorophyll in Bakterien (Burnham und Lascelles, 1963) und Pflanzen (Granick, 1961) darstellt.

ALA kann durch Kondensation aus Succinyl-CoA und Glycin mit Hilfe der ALA-Synthetase entstehen, in Tieren, Bakterien und Hefen (Shemin, 1970; Tait, 1972; Porra et al., 1972). In ergrünenden Pflanzen jedoch wurde dieses Enzym zuerst nicht gefunden (Beale, 1971). Daraufhin konnte gezeigt werden, daß in Gerste und Blättern einiger höherer Pflanzen ALA direkt aus dem Kohlenstoffgerüst von α -Ketoglutarat bzw. Glutamat entsteht (Abb. 2) (Beale und Castelfranco, 1974; Beale et al., 1975).

Abb. 2: Biosynthese von Phycocyanobilin (siehe Text)

Abkürzungen: A = Ethyliden = $\text{CH} - \text{CH}_2$; E = Ethyl
- $\text{CH}_2 - \text{CH}_2$; M = Methyl - CH_2 ; P = Propionsäure
- $\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$; V = Vinyl⁵ - $\text{CH} = \text{CH}_2$

1 = ALA-Synthetase; 2 = ALA-Dehydratase;

3 = Porphobilinogenase

a) Brown et al., 1981; $\longrightarrow$ bekannte, $\dashrightarrow$ mögliche
Synthesewege

Für *Cyanidium caldarium* diskutieren Jurgenson et al. (1976) ebenfalls diesen Weg. Ob ausschließlich der eine oder andere Weg beschriftet wird, muß in Frage gestellt werden, da in Hirse ALA-Synthetase nachgewiesen wurde (Hampp et al., 1975) und in *Scenedesmus obliquus* beide Synthesewege zu ALA führen (Klein und Senger, 1978). Die Kontrolle der ALA-Bildung durch Phytochrom konnten Kasemir und Mohr (1981) an *Pinus silvestris* zeigen.

Zwei Moleküle ALA kondensieren mit Hilfe der ALA-Dehydratase zu Porphobilinogen, dem Pyrrolgrundkörper (Abb. 2). Aus vier Porphobilinogenmolekülen entsteht ein cyclischer Tetrapyrrolkörper, das Prophyrinsystem Uroporphyrinogen III. Reaktionen an den Seitenketten und Oxidation des Makrocyclus führen zu Protoporphyrin IX. Der Einbau von Metallatomen führt im Fall des Magnesiums letztlich zu Chlorophyll, mit Eisen entstehen Cytochrome, Peroxidasen, Katalasen und Häm. Brown et al. (1981) konnten zeigen, daß die Phycobiline mit großer Wahrscheinlichkeit über Häm und nicht über ein Magnesium-Protoporphyrin gebildet werden. Analog der Bildung der Gallenfarbstoffe aus Häm in Säugtieren (Schmid und McDonagh, 1979) erfolgt die Ringöffnung an der α -Methinbrücke unter Ausbildung der beiden endständigen Lactam-Sauerstofffunktionen und der Entwicklung äquimolarer Mengen CO (Troxler, 1972). Nach dem "Zwei-Molekül-Mechanismus" stammen die beiden Lactam-Sauerstoffatome nicht aus einem einzigen O_2 -Molekül (Troxler et al., 1979; Brown et al., 1980). Ein der mikrosomalen Häm-Oxygenase der Säugetiere (Tenhunen et al., 1978, 1979) analoges Enzym konnte bisher allerdings in Pflanzen noch nicht nachgewiesen werden.

Die Frage nach dem Ort der Chromophorsynthese konnte bisher noch nicht geklärt werden. So faßt Schneider (1981) eine Reihe von Ergebnissen zusammen, die daraufhindeuten, daß die Enzyme für die Chlorophyllbiosynthese in den Plastiden

lokalisiert sind, wohingegen bekannt ist, daß Vorstufen des Häms teils in den Mitochondrien, teils im Cytoplasma gebildet werden.

5. Immunologie

Bisher wurden immunologische Methoden zur Charakterisierung der immunologischen Beziehung bzw. Verwandtschaft der Biliproteide untereinander angewendet. Dabei zeigte sich, daß zwischen den Biliproteinen einer Klasse (z.B. Phycocyanine) aus verschiedenen Organismen z.T. sehr starke Kreuzreaktionen auftreten (Berns, 1971), während die verschiedenen Biliproteine aus einem Organismus untereinander nicht verwandt sind (Glazer et al., 1971).

Der Nachweis von in vitro translatierten "precursor"-Proteinen wurde ebenfalls immunologisch durch Kreuzreaktion mit dem "fertigen" Protein geführt (Dobberstein et al., 1977; Walk und Hock, 1978).

Das Prinzip dieser Methoden besteht darin, daß Proteine mit einem gegen sie gerichteten Antiserum spezifisch reagieren und nur verwandte Proteine eine mehr oder weniger starke Kreuzreaktion zeigen (Antigen-Antikörper-Reaktion).

Als Antigen bezeichnet man dabei jede Substanz, die im menschlichen oder tierischen Organismus eine Immunreaktion auslöst. Diese Immunantwort, z.B. von Kaninchen, macht man sich zur Gewinnung eines spezifischen Antiserums gegen ein bestimmtes Protein zunutze. Untersuchungen über die Antigenität von Proteinen, deren Molekulargewicht größer als 3000 d sein muß, ergaben, daß sie mehrere Antigen determinanten besitzen, die meistens auf der Oberfläche der Moleküle exponiert sind. Diese Determinanten können in einer bestimmten Molekül-Konfiguration bestehen, zum anderen stellen auch lineare Segmente bestimmter Aminosäuresequenzen sogenannte "Antigen determinanten des Grundgerüsts"

dar (Fellenberg, 1978). Die Determinanten spielen die entscheidende Rolle bei der Antikörpererkennung.

Antikörper sind diejenigen Proteine im Blutserum, die sich auf Grund ihrer typischen bivalenten Y-Struktur (Fellenberg, 1978) spezifisch mit den Antigenen verbinden. Biochemisch werden die Antikörper als Immunglobuline (abgekürzt Ig) bezeichnet; unter diesen sind die IgG die klassischen oder "üblichen" Antikörper. Reagieren Antigen und Antikörper miteinander, entstehen Immunkomplexe. Diese Reaktion folgt einer Optimumskurve, die erstmals von Heidelberger aufgestellt wurde (Heidelberger und Kendall, 1935). Präzipitierbare Immunkomplexe bilden sich nur, wenn beide Komponenten in äquivalenten Verhältnissen miteinander reagieren. Sowohl bei Antigen- als auch bei Antikörperüberschuß verringert sich die Präzipitatenmenge (Abb. 3).

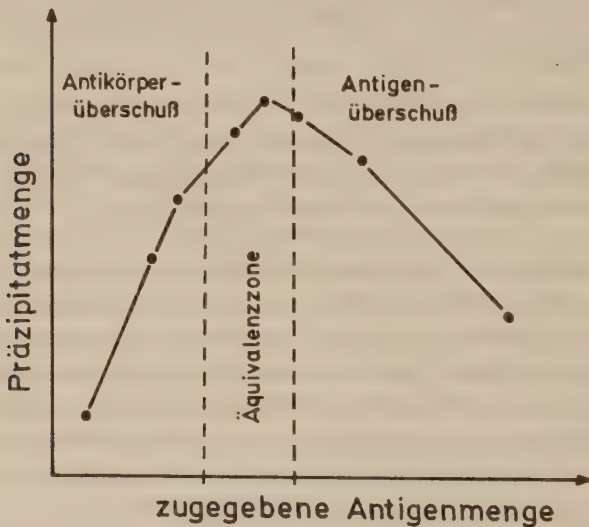


Abb. 3: Die Immunpräzipitatenmenge als Funktion der zugegebenen Antigenmenge (bei konstanter Antikörpermenge) (nach Fellenberg, 1978).

II. Aufgaben- und Problemstellung

Wie oben erwähnt, lagen zu Beginn dieser Arbeit keine Ergebnisse über die Synthese des Proteinanteils der Phycobiliproteine bzw. über den Mechanismus der Bindung des Chromophors an das Protein vor. In dieser Arbeit sollte mit Hilfe immunologischer Methoden (Gewinnung eines spezifischen Antiserums gegen Phycocyanin, Anwendung verschiedener immunchemischer Nachweismethoden) chromophorfreies Apoprotein von C-Phycocyanin aus *Cyanidium caldarium* nachgewiesen, isoliert und charakterisiert werden.

In diesem Zusammenhang sollte die Frage beantwortet werden, wie sich der Zusatz des Chromophor-Hemmstoffs Lävulinsäure auf die Apoproteinsynthese auswirkt sowie ihr Einfluß auf den Einbau einer exogen angebotenen Chromophorvorstufe (Häm) in C-Phycocyanin.

Weiter sollte untersucht werden, ob sich die Pigmentsynthese in *Cyanidium caldarium* durch Glucosezugabe beeinflussen läßt.

B. E r g e b n i s s e u n d D i s k u s s i o n

1. Taxonomie der einzelligen Alge Cyanidium caldarium

Für alle Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit diente die einzellige Alge *Cyanidium caldarium* als Ausgangsmaterial. Über die taxonomische Zuordnung dieser acidophilen, in heißen Quellen lebenden Alge herrscht offensichtlich noch keine gänzliche Klarheit. Wurde sie früher als Grünalge mit ungewöhnlicher Pigmentierung (C-Phycocyanin, Carotinoide, Chlorophyll a, aber kein Chlorophyll b) eingestuft (Allen, 1959), stellte Frederick (1976) sie auf Grund entsprechender Ergebnisse aus Immundiffusionstests als mögliches "missing link" zwischen prokaryotische Blaualgen und primitive eukaryotische Rotalgen.

Raven (1970) hingegen erklärt das Auftreten sowohl von Blaualgen- als auch von Rotalgen-Merkmalen mit der sogenannten "Endosymbiontenhypothese". Troxler et al. (1979) und Brown et al. (1980) sprechen nach anfänglicher Unklarheit von *Cyanidium caldarium* als einzelliger Rotalge, jedoch mit Bezug auf die Beschreibung von Allen.

In dieser Arbeit wurde die Mutante III-D-2 verwendet, die dem Wildstamm sehr ähnlich ist, im Licht aber mehr photosynthetisches Pigment pro Zelle produziert als dieser (Nichols und Bogorad, 1962).

2. Anzucht und Wachstum der Algen

Aus einer heterotroph im Dunkeln gehaltenen Stammkultur (Zelldichte 2×10^8 Zellen/ml) wurden bei Bedarf 1 l - Fernbachkolben zu einer Zelldichte von $\sim 1 \times 10^7$ Zellen/ml angeimpft. Nach 7 - 8 Tagen ist das Ende der logarithmischen Wachstumsphase erreicht ($\sim 10^8$ Zellen/ml). Erst nachdem nochmal zu 10^7 Zellen/ml überimpft worden war (noch heterotroph), wurden diese Zellen für die jeweiligen Versuche eingesetzt, um zu erreichen, daß der Ablauf der Wachstumsphasen reproduzierbar war.

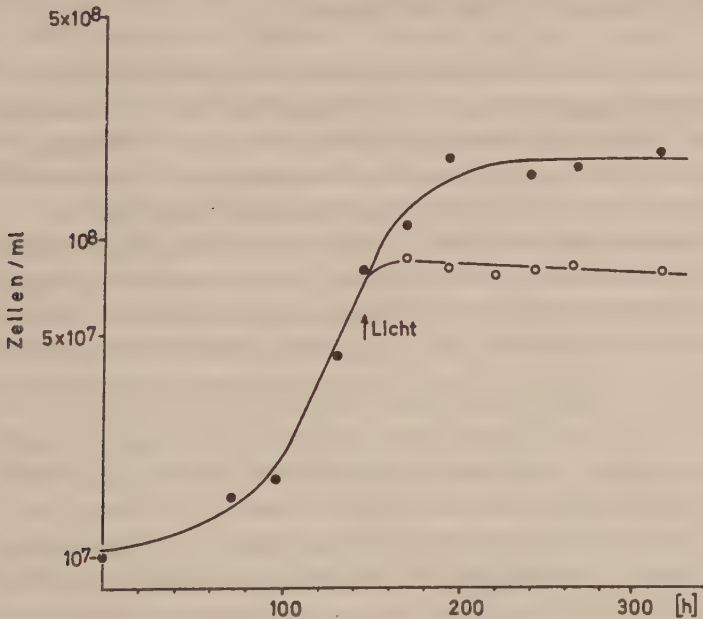


Abb. 4: Verlauf der Wachstumskurven von *Cyanidium caldarium* bei heterotropher Anzucht und nach Umsetzen der Algen ins Licht.

Überführt man im Dunkeln gewachsene Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase in glucosefreiem Medium ins Licht,

wird die Zellteilung zunächst gestoppt. Die Zellen produzieren Chlorophyll a, Allophycocyanin und Phycocyanin unter gleichzeitiger Ausbildung eines Chloroplasten pro Zelle (Bogorad et al., 1963). Der Verlauf der Wachstumskurven ist in Abb. 4 wiedergegeben.

Die im Dunkeln blaßgelben Zellen sind bereits nach einer Belichtungsdauer von 3 Tagen sichtbar ergrünt und nach ca. 7 Tagen zeigt die dunkelgrüne Farbe der Algen, daß ihr Pigmentgehalt sein Maximum erreicht hat.

3. Ernte und Aufschluß der Algenzellen

Die aufgetauten Algenzellen wurden in einer Vibrogen-Zellmühle aufgebrochen. Aufschlußzeiten von 2 Stunden erwiesen sich als notwendig, da nach 1 bzw. 1.5 Stunden erst ca. 50 % der Zellen aufgebrochen waren, wie die mikroskopische Kontrolle von entnommenen Proben zeigte. Die stabile Zellwand der Algen erwies sich selbst gegen starke mechanische Beanspruchung als extrem widerstandsfähig. Das Abspülen der aufgebrochenen Zellen von den Glasperlen wurde mit gekühltem Puffer und im Eisbad vorgenommen, um Proteaseaktivität weitgehend zu unterdrücken.

Nach Ultrazentrifugation erhielt man einen klaren Überstand, der je nach den Kulturbedingungen der Algen farblos bis kräftig blau mit starker roter Fluoreszenz war. Nach Dialyse und Gefriertrocknung wurden die Rohextrakte tiefgekühlt aufbewahrt. Für die Versuche wurden jeweils 50 mg Rohextrakt in 1 ml PBS bzw. H₂O bidest. gelöst. In einigen Fällen mußte von einer bräunlichen Trübung abzentrifugiert werden. Besonders nach Lagerung der Rohextrakte über Monate bei -18°C traten Trübungen von ausgefallenem Protein auf. Die Gesamtproteinmenge betrug zwischen 4 und 13 mg/ml Rohextrakt je nach Behandlung der Algen (Proteinbestimmung nach Heil und Zillig, 1970).

4. Gewinnung des Anti-PC-Antiserums

Elektrophoretisch reines Phycocyanin aus *C. caldarium* wurde zur Immunisierung von vier Kaninchen verwendet. Die Phycocyaninlösung (0.4 mg/ml NaPP) wurde im Verhältnis 1 : 1.5 mit komplettem Freund'schem Adjuvans sorgfältig emulgiert. Das komplette Adjuvans besteht aus einer Wasser-in-Öl-Emulsion, die zusätzlich abgetötete Mycobakterien enthält, die die lokale entzündliche Reaktion und damit die Immunantwort der Kaninchen auf das eingespritzte Fremdprotein noch verstärken, während das Mineralöl unter der Haut ein Depot bildet. Nach insgesamt 7 Wochen, einschließlich einer Booster-Injektion 5 Wochen nach der ersten Immunisierung, konnte den Tieren antikörperhaltiges Blut aus der Ohrvene entnommen werden. Nach Abtrennen der zellulären Bestandteile erhielt man das Rohserum, das für alle Versuche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Der Versuch, die Immunglobuline durch Ammonsulfatfällung (40 % Sättigung) von Fremdprotein abzutrennen, um dadurch in der SDS-Elektrophorese (vergl. 5.5) die Anzahl der Proteinbanden zu reduzieren, brachte keinen sichtbaren Vorteil gegenüber dem Rohserum.

In einem quantitativen Präzipitationsansatz wurden die Titer der Seren aus den vier Kaninchen verglichen. Von einer PC-Lösung (0.5 mg/ml) wurden steigende Mengen zu einer konstanten Menge des jeweiligen Serums pipettiert, auf 1ml mit PBS aufgefüllt und nach 24 Stunden die Extinktion (620 nm) der Überstände gemessen als Maß für nicht gefälltes PC (Tab. 1).

Deutlich ist zu erkennen, daß Anti-PC 4 bis zur Menge von 100 µl PC-Lösung (im Vergleich zu 1,2,3) am immunreaktivsten war, d.h. erheblich weniger nicht gefälltes PC im Überstand verblieben ist. Anti-PC 4', das zu einem früheren Zeitpunkt (~6 Monate früher) aus demselben Kaninchen gewonnen worden war, zeigte insgesamt höhere Immunaktivi-

Tab. 1: Extinktionen der Überstände (620 nm) nach Präzipitation von steigenden Mengen PC mit Antiseren aus vier Kaninchen (je 100 μ l) als Maß für den Titer des eingesetzten Antiserums; Endvolumen 1 ml
E = Extinktion des eingesetzten PC in 1 ml.

PC ul ein- gesetzt	E	Antiserum Anti-				
		PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 4'
25	0.038	0.005	0.016	0.025	0.008	0.004
50	0.076	0.055	0.054	0.061	0.024	0.026
100	0.152	0.135	0.140	0.134	0.112	0.090
150	0.228	0.210	0.215	0.215	0.215	0.175
200	0.304	0.295	0.290	0.290	0.285	0.250

tät, d.h. wenn keine Booster-Injektion erfolgt (wie in diesem Fall), nimmt der Titer der Antiseren mit der Zeit ab. In der überwiegenden Zahl der weiteren Versuche wurden daraufhin diese Antiseren eingesetzt.

5. Untersuchungen an Rohextrakten aus *Cyanidium caldarium*

Durch das Umsetzen der *C. caldarium*-Zellen ins Licht (vergl. 2.) kann die PC-Synthese induziert werden. Wenn PC über das Stadium eines farblosen Apoproteins gebildet wird, sollte man erwarten, während der Ergrünungsphase Hinweise auf ein solches Protein zu finden.

5.1 Proteingehalt der Rohextrakte und Einfluß von Glucose auf die PC-Synthese

Aus einer Algensuspension, die nach heterotrophem Wachstum ins Licht überführt worden war, wurden alle 24 Stunden (von Beginn der Belichtung an bis zu 7 Tagen) Aliquote zu je 100 ml entnommen und aufgearbeitet. Als Nullwert wurden 100 ml der dunkelgezogenen Algen entnommen. Mit einem Parallelansatz wurde genauso verfahren, jedoch enthielt

das Medium nach dem Umsetzen ins Licht nach wie vor 1 % Glucose. In den Rohextrakten wurde die Proteinmenge pro 100 ml Algensuspension bestimmt und nach Immunfällung mit Anti-PC-Antiserum die Präzipitatenmenge als Maß für PC bzw. anderes immunreaktives Protein (Apoprotein). Die Werte sind in Tab. 2 aufgeführt.

Es zeigte sich, daß die Proteinmengen in beiden Fällen im Verlauf der ersten 3 - 4 Tage stark zunahmen und dann relativ konstant blieben, wobei im Versuch mit Glucose die Werte deutlich unter denen der Parallelproben lagen. Das gleiche Ergebnis brachte auch die Bestimmung der Präzipitatenmengen, wobei die Präzipitate der Tage 0 und 1 unspezifische Niederschläge sein können, da die Ansätze z.T. bis zu 72 Stunden stehen gelassen wurden.

Tab. 2: Einfluß von 1 % Glucose im Medium ergrünender Algen (0-7 Tage Belichtung) auf Gesamtproteingehalt und Gehalt an immunreaktivem Protein.

Belich- tung	Gesamtprotein mg/100 ml Suspension		Präzipitatenmenge (mg Pro- tein/ml) pro 100 µl RE *	
	-Glucose	+Glucose	-Glucose	+Glucose
Tag				
0	7.71	7.71	1.16	1.07
1	6.01	3.12	1.81	1.17
2	8.94	11.10	2.52	(0.51)
3	22.27	17.78	5.11	3.20
4	39.64	23.95	16.00	6.54
7	39.51	21.95	17.76	6.28

* Die Konzentration der Rohextrakte (RE) betrug 50mg lyophilisierte Substanz/ml PBS. Die zugegebene Antiserummenge betrug zwischen 25 und 125 µl je nach Proteingehalt des Rohextrakts.

Die Tatsache, daß die Präzipitattmengen im Versuch mit Glucose gegenüber den Vergleichsproben z.T. um mehr als 50 % vermindert waren, läßt darauf schließen, daß bei Belichtung erwartungsgemäß hauptsächlich Photosyntheseprodukte wie PC (und Chlorophyll) gebildet werden. In Gegenwart von Glucose ist die Synthese dieser Pigmente nicht unbedingt erforderlich, da die Algen ihre C-Quelle direkt angeboten bekommen. Schneider und Bogorad (1979) fanden, daß Glucose die ALA-Bildung unterdrückt. Durch Glucose-Entzug konnten sie in *C. caldarium* III-D-2-Zellen die Chlorophyllsynthese im Dunkeln induzieren, jedoch nicht die Bildung von Phycobiliproteinen. Aus dieser Beobachtung schließen die Autoren, daß die Biliproteinsynthese neben der Regulation der ALA-Synthese noch weiteren Kontrollmechanismen unterliegt.

Nichols und Bogorad (1962) beschrieben die Zugabe von 1% Glucose zur Beschleunigung des Wachstums bei autotrophen Formen, was in Übereinstimmung steht mit dem Befund, daß die Algen im Licht ohne Glucose keine Zellvermehrung, sondern nur noch die Ausbildung des Photosyntheseapparates betreiben (vergl. B.2.).

5.2 Ultradünnschicht-Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden Proteine auf Grund ihres isoelektrischen Punktes in einem pH-Gradienten aufgetrennt. Der isoelektrische Punkt stellt den pH-Wert dar, bei dem die Nettoladung eines Proteins gleich Null ist. Proteine wandern im angelegten elektrischen Feld nur bis zu diesem Punkt, der für jedes Protein spezifisch ist, sie werden fokussiert. Im Gegensatz zur Auftrennung in einer Disc-Elektrophorese erfolgt hier eine Konzentrierung in besonders scharfe Banden. Der pH-Gradient im Polyacrylamid-Gel wird durch ein Gemisch von Ampholytmolekülen (käufliche aliphatische Polyamino-Polycarbonsäuren) aufgebaut, deren pI-Werte nur sehr ge-

ringe Unterschiede besitzen. Der pH-Gradient wird in der Regel vor dem Auftragen der Proben durch Präfokussierung aufgebaut und hat den niedrigsten pH-Wert an der Anode und den höchsten an der Kathode.

Die von Radola (1980) entwickelte Methode der Ultradünnschicht-Isoelektrischen Fokussierung auf nur 175 µm dicken Polyacrylamid-Gelen hat gegenüber herkömmlichen Methoden (Fokussierung in Gelröhrchen) entscheidende Vorteile. Bei vergleichsweise geringem Material- und Zeitaufwand konnte eine Auftrennung in zahlreiche scharfe Banden erzielt werden. Besonders bei Verwendung sogenannter "Mini-Gele" (Trennstrecke 4 cm) waren die Ergebnisse beeindruckend.

Für die isoelektrische Fokussierung wurden die Rohextrakte in H₂O bidest. gelöst, wobei die Proteinkonzentration zwischen 4 und 13 mg/ml (im Verlauf von 5 Tagen Belichtung) betrug. Es ist unbedingt notwendig, möglichst ionenfrei zu arbeiten, da geringste Spuren von Salzen die Auftrennung nachteilig beeinflussen. Dies äußerte sich in einigen Fällen in sogenannten "Zungeneffekten", d.h. die Proteinbanden waren zur Auftragstelle hin verzogen. Um dies zu vermeiden, wurden die Proben vielfach kurz vor dem Auftragen nochmal gegen H₂O bidest. dialysiert. Als sehr geeignet erwies sich eine mehrstündige Dialyse gegen 1 %-ige Glycin-Lösung.

Die Auftrennung von Rohextrakten der Tage 1 - 5 nach Belichtung im pH-Gradienten 4 - 9 ergab folgendes Bandenmuster (Abb. 5). Deutlich zu erkennen ist die starke Zunahme der PC-Bande, die bei einem pH von ca. 4.7 fokussiert. Sie ist bereits vor Anfärbung mit Coomassie-Blau an der blauen Eigenfarbe zu erkennen und zeigt im UV-Licht deutliche rote Fluoreszenz. Eine im Verlauf der 5 Tage auftretende und wieder abnehmende Bande, die einem Apoprotein zugeordnet werden könnte, war nicht zu identifizieren.

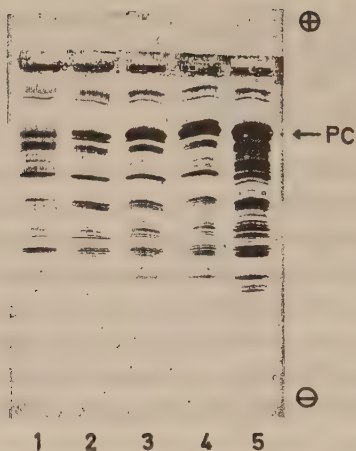


Abb. 5: Isoelektrische Fokussierung von Rohextrakten aus *C. caldarium* der Tage 1 - 5 nach Induktion der PC-Synthese durch Belichtung; pH-Gradient 4 - 9.

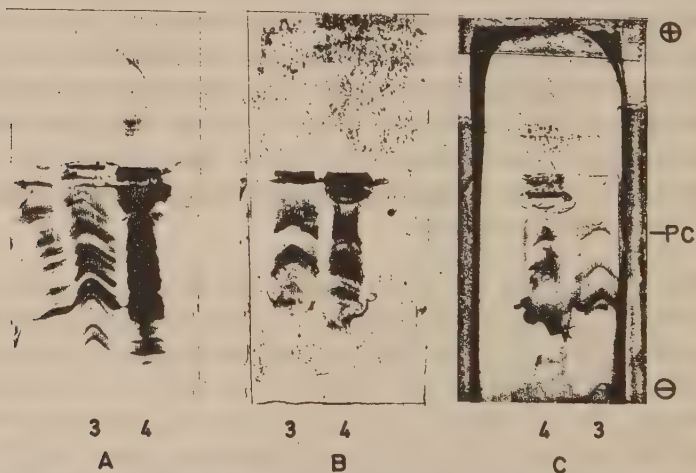


Abb. 6: Immunfixierung nach ultradünnschicht-isoelektrischer Fokussierung von Rohextrakten der Tage 3 und 4 nach Beginn der Belichtung.

- 6A: Fokugramm im pH-Gradienten 4 - 9, ohne Immunfixierung angefärbt
- 6B: Fokugramm, nach Immunfixierung angefärbt
- 6C: Celluloseacetat-"Abklatsch", nach Immunfixierung angefärbt

In einem weiteren Versuch wurden Rohextrakte der Tage 1 - 5 mit Anti-PC-Antiserum versetzt. Eine Auftrennung der Überstände dieser Ansätze durch isoelektrische Fokussierung sollte zeigen, ob im Vergleich zu unbehandelten Rohextrakten eine Bande fehlte. Dieses Protein hätte mit dem Antiserum reagiert und sich im Niederschlag befunden. Die Fokussierung der Überstände ergab jedoch sehr stark verschmierte, nicht zu interpretierende Banden, wohl in Folge der Größe der Immunglobuline, für die das Polyacrylamid-Gel zu engporig war.

5.3 Immunfixierung

Unter den oben beschriebenen Bedingungen war es also nicht möglich, ein eventuell nur in Spuren auftretendes Protein zu finden. Bei niedriger Konzentration sind Spurenkomponenten nicht sichtbar, bei höherer Konzentration sind fragliche Banden infolge Überladung des Gels möglicherweise überdeckt.

Die Methode der Immunfixierung (Arnaud et al., 1977), die bisher für Humanserum angewendet wurde, brachte dagegen weitere Aufschlüsse.

Mit Hilfe der Immunfixierung gelingt der Nachweis bestimmter Komponenten in einem Proteingemisch an Hand der Reaktion der aufgetrennten Proteine mit einem spezifischen Antiserum. Dazu wurde das Proteingemisch zuerst in einem ultradünnen Polyacrylamid-Gel isoelektrisch fokussiert und unmittelbar danach das Antiserum mittels eines Celluloseacetat-Streifens direkt auf das Gel aufgebracht. Nach 90 min wurden die nicht präzipitierten Proteine aus dem Gel und dem Streifen ausgewaschen. Es blieben nur solche Banden übrig, die mit dem Antiserum reagierten. Diese Banden ließen sich sowohl auf dem Gel als auch auf dem Celluloseacetat-Streifen mit Coomassie-Blau anfärben.

In diesem Fall wurden Rohextrakte des 3. und 4. Tages nach Beginn der Belichtung isoelektrisch fokussiert. Die Gele wurden etwas überladen, damit schwache Banden noch zu sehen waren. Die Immunfixierung lieferte mehrere Banden zusätzlich zur immer auftretenden Phycocyanin-Bande (Abb. 6). Die Lage der zusätzlichen Banden entspricht einem pH-Wert von 5 - 6.

Um sicher zu gehen, daß es sich nicht um Artefakte handelte, wurden verschiedene Kontrollversuche durchgeführt: Erstens eine "Fixierung" des Rohextraktes ohne Immunserum, d.h. der aufgelegte Celluloseacetat-Streifen war nur in Wasser getränkt, zweitens die Fixierung eines Nullwerts, d.h. ein Gel wurde ohne Rohextrakt fokussiert und dann mit Antiserum fixiert. Bei diesen Kontrollversuchen ergaben sich entweder gar keine oder nur sehr schwach anfärbbare Banden an anderer Stelle.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß in den Rohextrakten der Tage 3 und 4 nach Beginn der Belichtung ein oder mehrere Proteine auftreten, die zwar einen anderen isoelektrischen Punkt besitzen als PC, aber immunologisch verwandt sind, da sie mit dem spezifischen Anti-PC-Antiserum positiv reagierten.

Daß diese Proteine bei einem basischeren pH fokussieren als PC selbst, könnte seine Ursache einmal im Fehlen eines oder mehrerer Chromophore haben oder durch eben diese fehlenden Chromophore ist die Tertiärstruktur des Proteins so verändert, daß ein größerer Anteil an basischen Aminosäuren sich an der Oberfläche des Proteins befindet und so seine Nettoladung beeinflusst.

5.4 Ouchterlony-Doppeldiffusions-Test

Beim Ouchterlony-Test (Ouchterlony, 1962) läßt man Antigen und Antikörper in einem Agarosegel radial aufeinander zu

diffundieren. Treffen Antigen und Antikörper zusammen, bilden sich Immunkomplexe, die dort als Präzipitationslinien sichtbar werden, wo Antigen und Antikörper in äquivalenten Konzentrationen vorliegen. Der Vorteil der Doppeldiffusion gegenüber einer einfachen Geldiffusion, z.B. der Mancini-Technik (Mancini et al., 1965) besteht darin, daß die Reaktion eines Antiserums mit verschiedenen Antigenen direkt verglichen werden kann.

Grundsätzlich können drei Reaktionsmuster unterschieden werden, je nach Grad der Verwandtschaft der zu vergleichenden Antigene (Abb. 7).

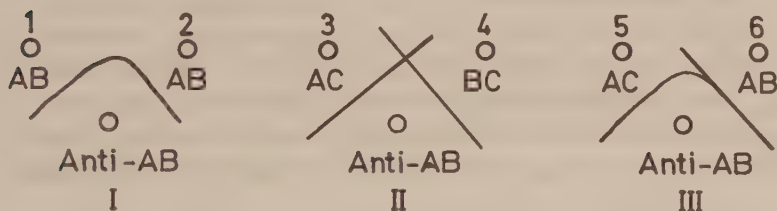


Abb. 7: Präzipitationsmuster bei der Doppeldiffusion
A, B, C: verschiedene Antigendeterminanten, die auf den Antigenen 1 - 6 lokalisiert sind.

- I: Immunologische Identität - fusionierende Linie
- II: Keinerlei serologische Verwandtschaft - Überkreuzung der Präzipitationslinien
- III: Partielle Identität oder Kreuzreaktion - Spornbildung. Beide Antigene sind in Bezug auf A identisch, deshalb die fusionierende Linie; Antigen 6 besitzt zusätzlich die Determinante B, deren Reaktion mit dem Antiserum den Sporn bildet.

Die Interpretation der Präzipitationsmuster erfordert eine gewisse Vorsicht. Besonders die Spornbildung kann leicht in unbalanzierten Systemen auftreten, d.h. wenn eines der zu vergleichenden Antigene wesentlich konzentrierter vorliegt als ein anderes (Clausen, 1971).

Die auftretenden Präzipitationslinien sind je nach Stärke und eventuell Eigenfarbe mit dem bloßen Auge im schräg einfallenden Licht zu erkennen. Sie können auch nach Auswaschen überschüssigen Antiserums mit Coomassie Blau angefärbt werden. Die auf Glasplatten getrockneten Gele sind unbegrenzt lange haltbar.

Für den Ouchterlony-Test wurden wieder Rohextrakte der Tage 1 - 5 nach Umsetzen ins Licht eingesetzt (Antigen), in der Mitte befand sich unverdünntes Antiserum. Die Proteinkonzentration der Rohextrakte entsprach der bei der isoelektrischen Fokussierung, das Lösungsmittel war hier PBS. In allen Parallelansätzen war folgende Beobachtung zu machen (Abb. 8): Rohextrakt Tag 1 zeigte keine Immunreaktion, bei Tag 2 bildete sich ein farbloses Immunpräzipitat, das häufig eine etwas verschwommene Linie darstellte, wobei in einem Fall zusätzlich eine schwache zweite Linie auftrat, zur Auftragstelle des Antiserums hin verschoben.

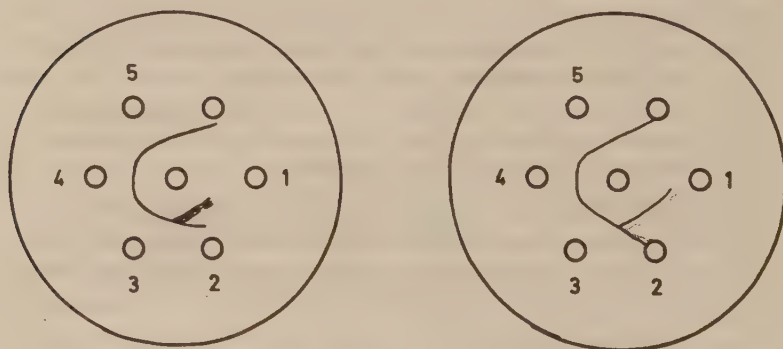


Abb. 8: Doppeldiffusionspräzipitate von Rohextrakten der Tage 1 - 5 nach Beginn der Belichtung der Algen. Konzentration der Rohextrakte: 50 mg lyophilisierte Substanz/ml PBS
Proteinkonzentration 4 - 13 mg/ml
Auftrag je 20 µl, unverdünntes Antiserum 20 µl

Ab Tag 3 waren die Präzipitationslinien scharf und deutlich ausgeprägt und zeigten zunehmend blaue Eigenfarbe und rote Fluoreszenz unter UV-Bestrahlung. In einigen Fällen konnten bei Tag 3 deutliche Spornbildung gegenüber Tag 2 beobachtet werden. Wie schon erwähnt, ist gerade die Spornbildung ein Phänomen, das bei ungleichen Konzentrationen der Antigene auftritt und das dürfte in diesem Fall die Ursache dafür gewesen sein. Die Proteinkonzentrationen in den Rohextrakten unterschieden sich doch beträchtlich (vergl. Tab. 2), außerdem konnte die Auftragsmenge in die Vertiefungen der Agaroseplatten nicht beliebig variiert werden, um die Konzentrationsunterschiede auszugleichen.

In einem anderen Fall (vergl. 6.6) konnte gezeigt werden, daß bei nachträglicher Konzentrierung des einen Rohextrakts die Spornbildung nicht mehr auftrat, sondern sich eine fusionierende Linie ergab.

Was die zusätzliche zweite Linie betraf, so wurde geprüft, ob dies auch eine Folge verschiedener Proteinkonzentrationen war. Von einem der Rohextrakte Tag 3 wurde eine Verdünnungsreihe bis zu 1 : 16 hergestellt und auf einer Agaroseplatte um eine zentrale Antiserumprobe aufgetragen (Abb. 9).

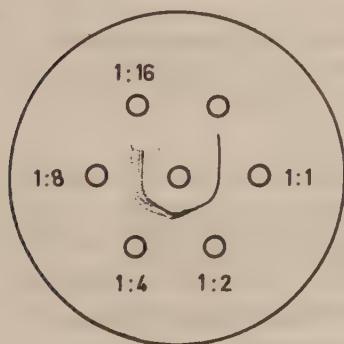


Abb. 9: Doppeldiffusionspräzipitate eines Rohextrakts nach 3-tägiger Belichtung der Algen in zunehmender Verdünnung (PBS). Proteinkonzentration der Ausgangslösung: 7.5 mg/ml
Auftrag je 10 µl, unverdünntes Antiserum 10 µl

Es zeigte sich, daß bei zunehmendem Antikörperüberschuß die Präzipitationslinien immer weniger scharf ausgeprägt und zur Auftragstelle des Antigens hin verschoben waren. Eine Aufspaltung in mehrere Banden konnte jedoch nicht beobachtet werden. Berns (1967) erklärte ein Auftreten mehrfacher Präzipitationslinien damit, daß möglicherweise Antikörper gegen verschiedene Antigen-Aggregate gebildet werden. Wenn dies hier der Fall wäre, sollte die Aufspaltung in allen Ansätzen auftreten, was aber nicht beobachtet werden konnte.

5.5 SDS-Elektrophorese der Immunpräzipitate aus den Rohextrakten

In Gegenwart des anionischen Tensids Natriumdodecylsulfat (SDS) wandern Proteine im elektrischen Feld allein nach ihrer Molekülgröße. Es bilden sich SDS-Protein-Komplexe, die an ihrer Oberfläche die negativen Ladungen der Sulfonsäuregruppen tragen. Diese Anionen sind in ihrer Mobilität ausschließlich von der Porengröße der verwendeten Acrylamid-Gele abhängig. Durch die Verwendung von exponentiellen Gradienten-Gelen (Mirault und Scherrer, 1971), in denen die Acrylamid-Konzentration von 5 bis 25 % kontinuierlich steigt (in der Vertikalelektrophorese von oben nach unten), können die Trennergebnisse noch verbessert werden.

Im vertikalen Plattengel läßt sich die Acrylamid-Konzentration für jedes beliebige Volumen nach folgender Formel berechnen:

$$c = c_2 + (c_1 - c_2) \times e^{-\frac{V}{V_1}}$$

c_1 = Konzentration der vorgelegten Acrylamid-Lösung = 5 %

c_2 = Konzentration der kontinuierlich zufließenden
Acrylamid-Lösung = 25 %

V = Gelvolumen, das sich bereits in der Kammer befindet

V_1 = Volumen der vorgelegten Acrylamid-Lösung = 12 ml

Für die angegebenen Konzentrationen und ein Gelkammervolumen von 20 ml gilt:

V (ml)	c (%)
0	5.0
5	11.8
10	16.3
15	19.3
20	21.2

Die Ausbildung des exponentiellen Gradienten in der Gelkammer ist in Abb. 10 veranschaulicht.

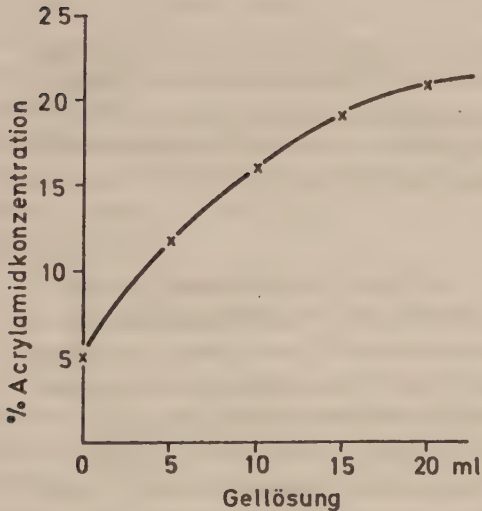


Abb. 10: Der exponentielle Acrylamidgradient in der Vertikalelektrophorese

Die Auftrennung von Immunpräzipitaten aus Rohextrakten der Tage 1 - 5 nach Induktion der PC-Synthese über SDS-Elektrophorese ergab das in Abb. 11 gezeigte Bandenmuster. Bei der Beurteilung, ob sich das Auftreten eines Apoproteins in der SDS-Elektrophorese bemerkbar macht, wurde auf zwei

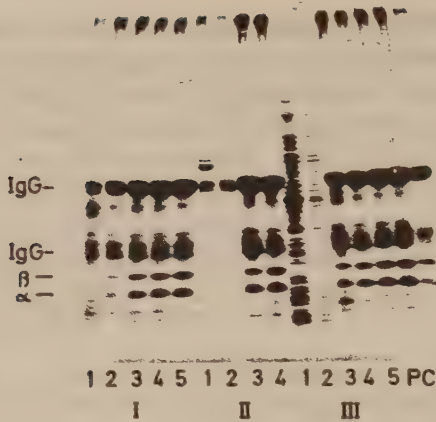


Abb. 11: SDS-Elektrophorese der Immunpräzipitate aus Rohextrakten der Tage 1 - 5 nach Beginn der Belichtung.

I - III: 3 unabhängige Aufarbeitungsserien
 IgG: schwere Untereinheit der Antikörpermoleküle bei ~50 kD, die leichte bei ~25 kD
 α und β: Untereinheiten des PC

Kriterien geachtet: Tritt eine neue Proteinbande in den ersten Tagen auf, die im Verlauf der Ergrünungsphase der Algen wieder abnimmt zugunsten von PC oder zeigt sich eine Veränderung im Bereich des PC-Proteins, das unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-Behandlung in seine kleinere α-Untereinheit (18300 d) und die etwas größere β-Untereinheit (19570 d) aufspaltet (Troxler et al., 1981; Offner et al., 1981).

Ein neu auftretendes Protein konnte, möglicherweise auch auf Grund der zahlreichen Proteinbanden, nicht identifiziert werden. Läge das Apoprotein des PC (gesamtes Protein, möglicherweise sogar schon in Untereinheiten getrennt, lediglich ohne Chromophore) bereits vor Beginn der Belichtung vor und würde durch Licht nur noch die Bindung des Chromophors induziert, sollte sich an der Kon-

zentration der α - und β -Proteinbanden nichts ändern. In demselben Maß wie Apoprotein durch Chromophorbinding abnimmt, entsteht PC. Ob die geringen Molekulargewichtsunterschiede, die durch die Chromophore entstehen, auf der SDS-Elektrophorese aufgelöst werden können, ist fraglich.

Tatsächlich aber nahm der Proteingehalt im Bereich der Untereinheiten im Verlauf der Belichtung stark zu (vergl. auch 5.1 und 5.2), d.h. PC entsteht nicht aus einem bereits in dieser Form vorliegenden Protein.

Abb. 11 zeigt die aufgetrennten Immunpräzipitate aus drei Aufarbeitungsserien. In Serie I sind bereits am Tag 2 schwache Banden der Untereinheiten zu erkennen, während bei den Tagen 1 und 2 der nächsten Serie hauptsächlich die Banden der Immunglobuline auftraten. Die Bahnen 1 und 2 der 3. Serie zeigen, daß nur unspezifische Niederschläge aufgetrennt worden waren. Diese Niederschläge waren innerhalb von 3 - 4 Tagen entstanden, in denen die Ansätze zur Bildung der Immunpräzipitate bei 4°C gehalten worden waren. In den anderen Fällen war die Präzipitation bereits nach 24 Stunden erfolgt.

5.6 Schlußfolgerungen

Die mit Hilfe der Immunfixierung erhaltenen Befunde deuten darauf hin, daß im Verlauf der Ergrünungsphase der Algen, innerhalb der ersten 5 - 7 Tage, ein Protein auftritt, das mit Anti-PC-Antiserum reagiert, aber nicht mit PC identisch ist, sondern einen anderen, basischeren isoelektrischen Punkt besitzt. Im Ouchterlony-Doppeldiffusions-Test konnte ein solches Protein nicht identifiziert werden, jedenfalls war es nicht durch abweichendes Präzipitationsverhalten zu erkennen. Die aufgetretene Spornbildung, die jedoch auf Grund nachfolgender Versuche (vergl. 6.6) mit großer Sicherheit als Artefakt betrachtet werden muß, könn-

te andernfalls dahingehend interpretiert werden, daß das Protein, welches bei Tag 3 präzipitiert, zusätzliche Determinanten gegenüber jenem von Tag 2 besitzt. Ausgehend von der Überlegung, daß das gesuchte Apoprotein ein PC-Protein ohne Chromophore ist, kämen als zusätzlich vorhandene Determinanten eben diese Chromophore in Frage, was aber auf Grund von Immunreaktionen an Phycoerythrin mit modifizierten Chromophoren (Sepp, 1981) mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann. Welcher Art die Antigen-determinanten des PC sind, ist bisher noch nicht bekannt. Denkbar wäre auch eine veränderte Tertiärstruktur des Apoproteins infolge der fehlenden Chromophore, sodaß nicht mehr so viele Determinanten (Konformations- oder Sequenzdeterminanten) auf der Oberfläche exponiert sind wie im kompletten PC.

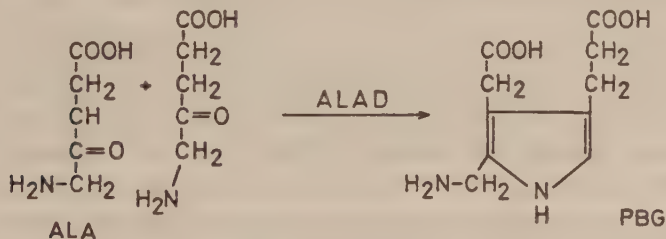
Aus den Ergebnissen der SDS-Elektrophorese der Immunpräzipitate kann geschlossen werden, daß PC nicht aus einem bereits vor der Belichtung existierenden Pool an Apoprotein mit der Molekülgröße der α - und β -Untereinheiten entsteht. Womit allerdings nicht ausgeschlossen ist, daß es sich um ein höhermolekulares Protein handelt, dessen Bande in der Elektrophorese durch andere Proteinbanden verdeckt ist. Außerdem ist nicht sicher, ob unter diesen Versuchsbedingungen überhaupt freies Apoprotein auftritt. Wie der Ouchterlony-Test und auch die Präzipitaten-mengen aus den Rohextrakten der ersten Belichtungstage zeigen, ist die Konzentration an immunaktivem Protein insgesamt in dieser Zeit noch recht gering.

6. Spezifische Hemmung der Phycocyanobilin-Synthese

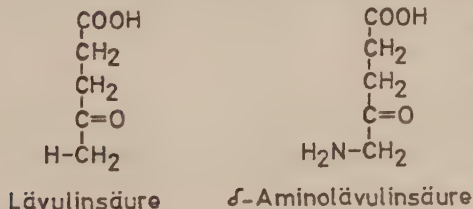
Geht man davon aus, daß das Apoprotein oder "precursor"-Protein im Verlauf der Biosynthese zum PC lediglich vorübergehend auftritt, d.h. es kurz nach seiner Bildung mit Phycocyanobilin-Chromophor reagiert, daß es sich also in einem Fließgleichgewicht mit PC befindet, wird seine Konzentration zu jedem Zeitpunkt dementsprechend gering sein. Um größere Mengen Apoprotein zu erhalten, wurde versucht, gezielt die Synthese des Chromophors zu hemmen, während die Proteinsynthese ungehindert ablaufen sollte.

6.1 Einfluß von Lävulinsäure auf die Chromophor-Synthese

Eine Schlüsselstelle für den Eingriff in die Porphyrinbiosynthese stellt die Kondensation von zwei Molekülen ALA zu Porphobilinogen dar (vergl. Schema S. 8).



Nandi und Shemin (1968) konnten zeigen, daß Lävulinsäure (LA) auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit 5-Aminolävulinsäure (ALA) kompetitiv hemmend auf die ALA-Dehydratase wirkt und so die Bildung des Porphobilinogens unterdrückt.



Liegt der Hemmstoff (LA) in genügend hoher Konzentration vor, so kann er das eigentliche Substrat (ALA) völlig vom Enzym verdrängen und dadurch die Reaktion (Kondensation) blockieren. Da sich in diesem Fall eine Hemmung der Reaktion auf den gesamten Porphyrinstoffwechsel (Synthese der Cytochrome, Chlorophyll etc.) auswirkt, wäre eine totale Hemmung für die Algen letal. Die LA-Konzentration wurde entsprechend der Zelldichte variiert und lag mit 2 - 5 mM in dem von Jurgenson et al. (1976) angegebenen Bereich ($4 \text{ mM}/10^8 \text{ Zellen/ml}$). Bei dieser Konzentration ist die Chromophorsynthese zwar nicht vollständig blockiert, aber es sollte auf jeden Fall das Verhältnis "Apoprotein" zu Chromophor bzw. inkomplettes PC (weniger Chromophore) zu PC zugunsten des "Apoproteins" verschoben sein. Die Schreibweise "Apoprotein" bezeichnet im weiteren Verlauf Protein, dessen Chromophorgehalt unter LA-Einfluß vermindert ist.

6.2 Inkubation der Algenzellen mit Lävulinsäure

Im Dunkeln heterotroph angezogenen Algen wurde zu Beginn der Belichtung LA steril zuzufiltrierte. Durch die Lichtinduktion sollte die PC-Proteinsynthese einsetzen, jedoch kein vollständiges PC gebildet werden. Als die Algenzellen nach 3-tägiger Belichtung geerntet wurden, waren sie schmutzig gelb-grün, während die Kontrolle ohne LA die grüne Farbe der normal Pigment-synthetisierenden *C. caldarium*-Zellen zeigte. Während der Inkubation mit LA nahm außerdem die Zelldichte um 10 - 15 % ab, während sie in den Kontrollen annähernd gleich blieb (Tab. 3), ebenso sank der Anteil an großen Zellen (ϕ ca. 2 μm) um etwa die Hälfte, es traten vorwiegend kleinere Zellen (ϕ ca. 1 μm) auf.

Tab. 3: Zellzahl/ml $\times 10^7$ während 3-tägiger Belichtung in Gegenwart von Lävulinsäure (+LA) und ohne Lävulinsäure (Kontrolle -LA).

Belichtung	Zellen -LA	Zellen +LA
0 h	8.17	8.13
24 h	8.75	8.63
48 h	8.05	6.89
72 h	7.93	7.03

6.3 PC-Gehalt in Rohextrakten aus LA-behandelten Algen

Die von den Rohextrakten aufgenommenen Absorptionsspektren zeigen einen deutlich verminderten PC-Anteil ($\rightarrow E_{620}$) in den LA-behandelten Proben gegenüber den Kontrollen ohne LA (Abb. 12a). Der PC-Gehalt in mg wurde über die Extinktion der Rohextrakte bei 620 nm berechnet. Aus 6 bzw. 5 Bestimmungen für Rohextrakte aus LA-behandelten bzw. unbehandelten Algen ergaben sich die PC-Gehalte bezogen jeweils auf 10^{11} Zellen zum Zeitpunkt der Ernte (Tab. 4).

Tab. 4: PC-Gehalt in Rohextrakten aus LA-behandelten und unbehandelten Algen nach 72 h Licht in $\text{mg}/10^{11}$ Zellen zum Zeitpunkt der Ernte (Einzelwerte).

Ansatz	RE - LA	RE + LA
1	3.57	0.13
2	5.14	0.13
3	6.69	0.26
4	5.05	0.27
5	3.98	0.12
6		(0.58)

Der Mittelwert für das Verhältnis des PC-Gehalts in Rohextrakten aus unbehandelten zu LA-behandelten Algen liegt bei 27.1, berücksichtigt man die Standardabweichung, reicht der Faktor von 14.1 bis 61.0 (Abb. 12b). Mit anderen Worten, die Synthese von komplettem PC wurde durch Lävulinsäure im Schnitt um den Faktor 27.1 vermindert.

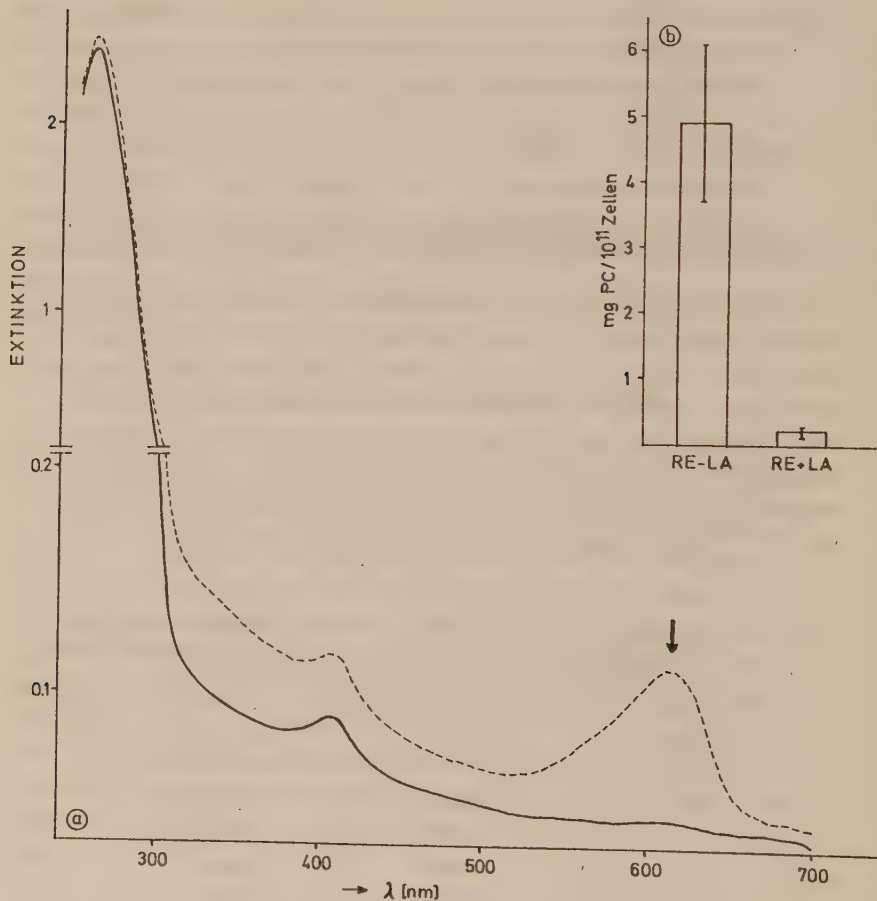


Abb. 12: Einfluß der Lävulinsäure auf die Bildung von PC in *C. caldarium* nach 3 Tagen Belichtung:
a) Absorptionsspektren --- Rohextrakt aus unbehandelten, — aus LA-behandelten Algen
b) PC-Gehalt in Rohextrakten: Mittelwerte aus Tab. 4 mit Standardabweichung.

Die teilweise starken Schwankungen der Werte sind außer durch die biologische Streuung möglicherweise durch unterschiedliche Ausbeuten beim Aufbrechen der Algen bedingt, da der PC-Gehalt auf die Zellzahl der Algen zum Zeitpunkt der Ernte bezogen wurde und nicht auf tatsächlich enthaltenes Gesamtprotein im Rohextrakt.

Es muß außerdem angenommen werden, daß die zugesetzte Lävulinsäure von Ansatz zu Ansatz unterschiedlich stark wirksam war, obwohl die LA-Konzentration entsprechend der Zelldichte variiert wurde, um möglichst vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Wie in einem späteren Versuch festgestellt wurde, ist die Wirksamkeit der LA offenbar davon abhängig, wie lange eine LA-Stammlösung vor Gebrauch aufbewahrt worden war. So wurden in einem Parallelansatz 3 Kolben dunkelgezogener *C. caldarium*-Zellen mit LA versetzt, die bereits 1 Monat als 1 M - Stammlösung lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert worden war und gleichzeitig 3 Kolben mit frisch angesetzter LA behandelt. Alle 6 Kolben wurden belichtet. Die 3 Kolben, die die alte LA enthielten, zeigten schon nach 2 Tagen deutliche Grünfärbung, während bei den anderen noch keine sichtbare Pigmentsynthese eingetreten war.

6.4 Quantitative Präzipitation

Wie oben gezeigt, konnte die Chromophorsynthese durch Lävulinsäure gehemmt werden. Es wurde nun weiter untersucht, ob unabhängig davon die Synthese des "Apoproteins" stattfindet. Dazu wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Rohextrakte (RE - LA, RE + LA) sowie einer angereicherten PC-Lösung angesetzt und mit konstanter Menge Antiserum präzipitiert. Die PC-Menge in den eingesetzten Lösungen wurde spektroskopisch bestimmt, die Gesamtproteinmenge in den Präzipitaten wurde mit der Proteinbestimmungsmethode ermittelt.

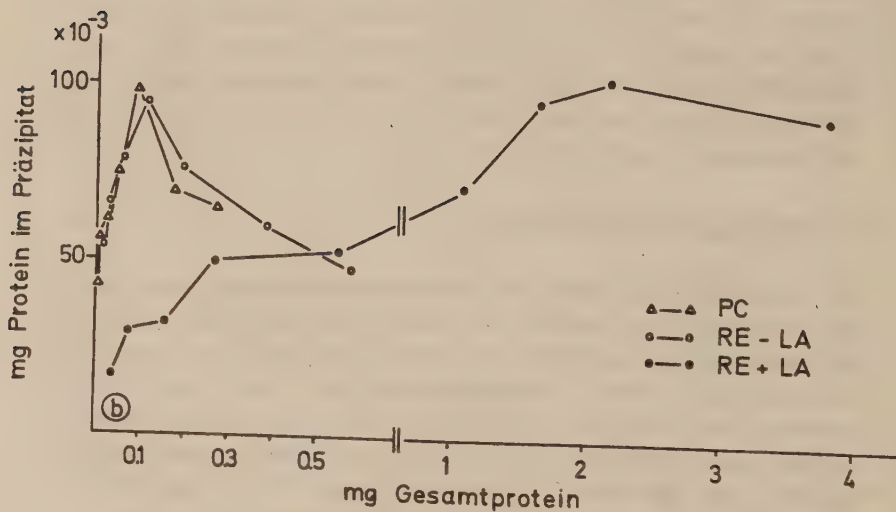
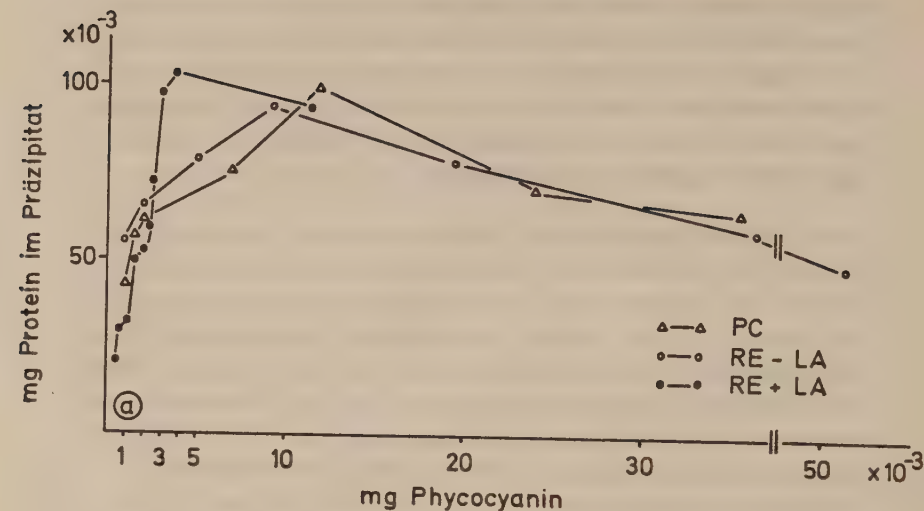


Abb. 13: Quantitative Präzipitation von angereichertem PC und Rohextrakten aus unbehandelten sowie LA-behandelten Algen nach 3-tägiger Belichtung mit jeweils mit 50 μ l unverdünntem Anti-PC-Antiserum
 a) bezogen auf PC-Gehalt der eingesetzten Lösungen
 b) bezogen auf Gesamtproteingehalt der Lösungen

Wie sich aus Abb. 13a ergibt, erfolgte für den RE + LA bereits bei einem PC-Gehalt von 3 - 4 μg im Ansatz maximale Präzipitation, während dies in den beiden Parallelansätzen für RE - LA und PC erst bei 9 bzw. 12 μg der Fall war. Maximale Präzipitation erfolgt aber nur dann, wenn Antigen und Antikörper in äquivalenten Konzentrationen vorliegen. Für 50 μl des verwendeten Antiserums liegt die Antigenmenge demnach bei ca. 10 μg . Da im ersten Fall (RE + LA) der PC-Anteil nur rund ein Drittel beträgt, kann das nur bedeuten, daß neben PC farbloses Protein immunologisch reagierte.

Im Fall des RE + LA muß, wie aus Abb. 13b ersichtlich wird, absolut gesehen, um ein Vielfaches (ca. 25-fach) mehr Rohextrakt pro vorgegebener Antiserummenge eingesetzt werden, um maximale Präzipitation zu erzielen, d.h. die immunreaktiven Proteine sind lediglich in geringer Menge vorhanden.

6.5 Chromophor-Protein-Verhältnis in Immunpräzipitaten

In einem weiteren Versuch wurden die gewaschenen Präzipitate in 1 N Essigsäure aufgelöst und an Hand der aufgezeichneten Absorptionsspektren die Extinktionsverhältnisse von Protein zu Chromophor bestimmt ($E_{280} : E_{620}$). In 3 unabhängigen Bestimmungen wurden verglichen: Rohextrakt aus LA-behandelten Algenzellen nach 3 Tagen Belichtung und Rohextrakt aus unbehandelten Algen nach 7 Tagen Belichtung. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 dargestellt. Die Messung der Extinktion bei 620 nm wurde durch die geringen Mengen an PC erschwert und bei Verstärkung der Signale trat starkes Grundrauschen auf. Doch auch unter der Annahme, daß die Werte schwanken, bleiben die Unterschiede in den Zahlenverhältnissen zwischen RE + LA und RE - LA signifikant.

Tab. 5: Verhältnis von Protein- zu Chromophorgehalt in aufgelösten Immunpräzipitaten aus Rohextrakten LA-behandelter Algen sowie in den Kontrollen (-LA).
1 - 3: Einzelwerte; 4: Mittelwerte

	RE + LA			RE - LA		
	E_{280}	E_{620}	E_{280}/E_{620}	E_{280}	E_{620}	E_{280}/E_{620}
1	0.790	0.028	28.2	0.358	0.056	6.4
2	0.930	0.024	38.7	0.712	0.072	9.9
3	0.545	0.012	45.4	0.662	0.048	13.8
4	0.755	0.021	35.9	0.577	0.058	9.9

In Übereinstimmung mit dem vorangegangenen Versuch zeigte sich auch hier, daß, auf PC bezogen, in den LA-behandelten Proben mehr Protein ausgefällt wurde als in den Kontrollen. In die Gesamtproteinmenge im Präzipitat geht neben Antigenprotein auch Antiserumprotein ein, doch darf davon ausgegangen werden, daß für die Präzipitation einer bestimmten Menge PC eine bestimmte Menge (annähernd gleichbleibend) Antiserum benötigt wird. Auf Grund selbst durchgeführter Versuche sowie Literaturdaten (Fellenberg, 1978) wurde mit einem Verhältnis von 10 : 1 für Antikörper zu Antigen kalkuliert. Unter der Annahme, daß für das "Apoprotein" der gleiche Faktor gilt, ergibt sich für die LA-behandelten Proben ein Gehalt an "Apoprotein", der dem 2.5 - 2.5-fachen an PC entspricht. Ein Vergleich mit den Daten aus der quantitativen Präzipitation zeigt, daß für RE + LA maximale Präzipitatsmenge bei einem PC-Gehalt von etwa 50 % im Vergleich zur Kontrolle erzielt wurde, was in guter Übereinstimmung mit den hier gefundenen Daten steht.

6.6 Ouchterlony-Doppeldiffusion

RE + LA und RE - LA wurden im Ouchterlony-Test direkt miteinander verglichen. Zuerst wurden von beiden Rohextrakten, ungeachtet ihres Gesamtproteingehalts, die gleichen Volumina, je 10 und 20 μ l, zum Test eingesetzt. Es entstanden Präzipitationslinien mit einem stark ausgeprägten Sporn von RE - LA gegenüber RE + LA (Abb. 14a). Darufhin wurde der RE + LA auf das Zehnfache konzentriert (Gefriertrocknung und Lösen in einem Zehntel des vorherigen Volumens) und der RE - LA 1 : 2 und 1 : 10 verdünnt. Im anschließenden Ouchterlony-Test zeigte sich eine eindeutig fusionierende Linie (vergl. auch 5.4), die im Fall des RE + LA schwach blau gefärbt war, bei RE - LA jedoch kräftig blau mit deutlicher Fluoreszenz unter UV-Licht (Abb. 14b).

Es entsteht also auch nach LA-Behandlung kein Protein, das sich im Präzipitationsverhalten von PC unterscheiden ließe. Entweder sind zumindest die Determinanten an der Oberfläche ausgebildet, die auch beim PC die Immunreaktion verursachen oder es reagiert hauptsächlich das im RE + LA noch vorhandene PC sichtbar.

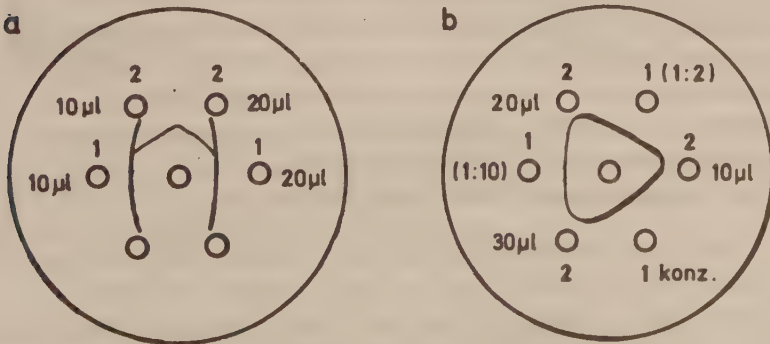


Abb. 14: Ouchterlony-Doppeldiffusionspräzipitate der RE - LA (1) und RE + LA (2)
a) großer Unterschied in beiden Proteinkonzentrationen
b) RE + LA 10-fach konzentriert und RE - LA in den jeweils angegebenen Verdünnungen (je 10 μ l)
In der Mitte je 10 μ l unverdünntes Antiserum

6.7 SDS-Elektrophorese der Immunpräzipitate

Wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, trat bei Hemmung der Chromophorsynthese durch Lävulinsäure farblores Protein auf, das mit Anti-PC-Antiserum ausgefällt werden konnte. Die Auftrennung solcher Immunpräzipitate in der SDS-Elektrophorese sollte Aufschluß darüber geben, in welchem Molekulargewichtsbereich man ein solches Protein findet. Grundsätzlich können hier wieder zwei Möglichkeiten diskutiert werden (vergl. 5.5):

a) Das gesuchte Protein liegt bereits in Form der α - und β -Untereinheit des späteren PC vor, jedoch ohne Chromophore bzw. mit einer reduzierten Anzahl von Chromophoren, d.h. es wandert nahezu ununterscheidbar von den aufgetrennten Untereinheiten des kompletten PC. Möglicherweise macht sich auch das Fehlen eines oder mehrerer Chromophore (MG 600) in einer zusätzlichen Bande bemerkbar, die auf Grund des kleineren Molekulargewichts etwas weiter wandert als die zugehörige Untereinheiten-Bande.

Zu dieser Hypothese ergibt sich noch eine weitere Möglichkeit: Es werden die Untereinheiten getrennt synthetisiert, aber mit einer Anzahl zusätzlicher Aminosäuren (Extrasequenz), wie es für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (Roy et al., 1977) und zwei Untereinheiten des Chlorophyll a/b-Proteinkomplexes (Schmidt et al., 1981) gefunden wurde. In diesem Fall wären Proteinbanden zu erwarten, die weniger weit wandern als die entsprechenden Untereinheiten-Banden.

b) In dem neuen Protein sind α - und β -Kette noch nicht getrennt und es besitzt ein Molekulargewicht von etwa 38000 (Summe α und β) bzw. noch höher, wenn das Protein mit einer Extrasequenz synthetisiert wird, die erst in einem weiteren Schritt verloren geht (processiert wird): es sollte eine zusätzliche Proteinbande auftreten.

Es wurden Präzipitate aus Rohextrakten LA-behandelter Algen nach 3 bzw. 4 Tagen Belichtung mit präzipitierten Rohextrakten aus unbehandelten Algen nach 7 Tagen Belichtung verglichen (Abb. 15). Die Auftragsmenge wurde so gewählt, daß sie im einen Fall derselben Chromophormenge in den Präzipitaten entsprach (Bahn 1+2: RE + LA, Bahn 3: RE - LA). Daneben wurde versucht, jeweils die gleiche Proteinmenge aufzutragen (Bahn 4+5: RE + LA, Bahn 6: RE - LA), was jedoch nicht vollständig gelungen war.



Abb. 15: SDS-Elektrophorese von Immunpräzipitaten aus Rohextrakten

- 1 + 4: LA-Behandlung (3 Tage Belichtung)
 2 + 5: " (4 Tage Belichtung)
 3 + 6: ohne LA (7 Tage Belichtung)
 1 - 3: gleicher Chromophorgehalt
 4 - 6: vergleichbarer Proteingehalt

Auch hier ist wieder deutlich erkennbar, daß, auf den gleichen Chromophorgehalt bezogen, im RE + LA erheblich mehr Protein präzipitiert wurde (und auf die Elektrophorese aufgetragen) als im Kontrollansatz. Eine neu aufgetretene Proteinbande konnte nicht gefunden werden, im Unter-

einheitenbereich zeigte sich jedoch bei RE + LA eine deutlich sichtbare Aufspaltung in 3 bzw. 2 Proteinbanden der im anderen Fall einheitlichen α - und β -Banden: eine zusätzliche, stärkere Bande mit kleinerem Molekulargewicht unterhalb der β -Proteinbande, während neben der α -Untereinheit sowohl eine größere als auch eine kleinere Proteinbande erschienen. Die hier gefundene Aufspaltung trat allerdings in einigen der nachfolgenden SDS-Elektrophoresen ebenso bei Rohextrakten aus unbehandelten Algen wie bei reinen PC-Präparationen auf (Abb. 16).

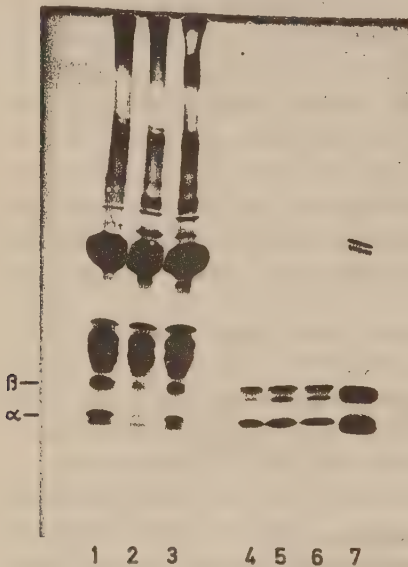


Abb. 16: SDS-Elektrophorese von Immunpräzipitaten aus PC (1), zwei verschiedenen RE + LA (2+3), sowie nicht präzipitierte Fraktionen nach präparativer IEF von PC (4-7).

Es könnte sich dabei um heterogene Untereinheiten-Spezies bzw. um proteolytische Produkte handeln. So beschreibt Muckle (1978) zwei verschiedene Phycoerythrine, PE I und PE II, besonders aus *Phormidium persicinum*, die je nach Aufarbeitung bzw. Alter der aufgearbeiteten Algenzellen in unterschiedlichen Verhältnissen auftraten. Als Ursache vermutete O'hEocha (1962) proteolytischen Abbau in den Rohextrakten. So fanden auch Briggs und Rice (1972) bei

Phytochrom-Aufarbeitungen Proteasen in den Rohextrakten. Weiterhin wurde beobachtet, daß die Mengenverhältnisse in den aufgespaltenen Banden von Versuch zu Versuch variierten und die Aufspaltung auch nicht immer beide Untereinheiten gleichermaßen betraf.

Letztlich bleibt aber doch die Überlegung, warum unter LA-Einfluß im Bereich der Untereinheiten im Verhältnis zum Chromophorgehalt deutlich mehr Protein auftritt. Wäre nur das dem Chromophorgehalt entsprechende Protein enthalten, sollte die jeweilige Proteinbande nicht stärker sein als die der Kontrolle, da ja die beiden Proben entsprechend der gleichen Chromophormenge aufgetragen wurden. Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten daraufhin, daß es sich bei diesen farblosen Proteinen um die "Apoproteine" der α - und β -Untereinheiten handeln könnte.

7. Radioaktive Markierung mit ^3H -Leucin

Zweck dieser Versuche war es, an Hand der radioaktiven Markierung Proteine, die als mögliches "Apoprotein" betrachtet werden können, gezielter nachweisen zu können.

Dazu wurde dunkelgezogenen Algen gleichzeitig mit Beginn der Belichtung ^3H -Leucin zugesetzt. Es ist zwar anzunehmen, daß während der 3 Tage Inkubation außer neu synthetisiertem PC bzw. "Apoprotein" weitere Proteine durch Neusynthese oder Umbau ebenfalls radioaktiv markiert worden waren. Durch Behandlung der Rohextrakte mit Anti-PC-Antiserum wurden jedoch spezifisch PC bzw. als "Apoprotein" in Frage kommendes Protein als Immunpräzipitat abgetrennt und als solches weiter untersucht.

7.1 Versuch zur Aufnahme von ^3H -Leucin durch die Algenzellen

Mit Beginn der Belichtung wurde den Algen in 3 Parallelansätzen jeweils eine konstante Menge ^3H -Leucin angeboten, zu Ansatz 2 und 3 zusätzlich steigende Mengen kaltes Leucin gegeben. Die Abnahme der Radioaktivität im Medium wurde verfolgt (Tab. 6). Pro 100 ml Algensuspension wurden zugegeben:

Kolben 1: 0.09 nMol ^3H -Leucin ($\hat{=}$ 10 μCi)

Kolben 2: 0.09 nMol ^3H -Leucin ($\hat{=}$ 10 μCi) + 10 μMol
kaltes Leucin

Kolben 3: 0.09 nMol ^3H -Leucin ($\hat{=}$ 10 μCi) + 100 μMol
kaltes Leucin

d.h. die Endkonzentrationen an Leucin in Kolben 2 und 3 betrugen 100 μmolar bzw. 1 mmolar.

Tab. 6: Abnahme der Radioaktivität im Medium im Verlauf von 72 h Belichtung in Abhängigkeit von der Gesamt-Leucin-Konzentration;
cpm $\times 10^3$ bezogen auf 100 ml Medium

Kolben	0 h	24 h	48 h	72 h
1	1926	2046	2107	1967
2	8955	6047	5823	5440
3	9265	8019	7653	6915

In den aus diesen Algen gewonnenen Rohextrakten wurde die Radioaktivität bestimmt (Tab. 7). Der Vergleich für die Kolben 1 und 2 zeigt für 2 immerhin ca. 50 % der Aktivität von 1, obwohl das eingesetzte ^3H -Leucin im zweiten Fall um den Faktor 100000 mit kaltem Leucin verdünnt war. Es besteht offensichtlich durch exogen verabreichtes Leucin ein starker Konzentrationsdruck in die Zellen.

Tab. 7: ^3H -Markierung in Rohextrakten aus Algen, die mit steigenden Mengen Leucin inkubiert wurden (siehe Text); $\text{cpm} \times 10^3$ in 10 ml ultrazentrifugiertem bzw. 2 ml gefriergetrocknetem Rohextrakt.

Ansatz	Rohextrakt nach Ultrazentrifugation	Gefriergetrockneter Rohextrakt
1	1710	1960
2	1020	910
3	750	300

Die abweichenden Werte, die für Ansatz 1 im Medium gemessen wurden (sehr starke und über 72 h unveränderte Abnahme), haben ihre Ursache möglicherweise in einer unspezifischen Adsorption des Leucins an der Oberfläche der Zellen, die sich in Kolben 1 auf Grund der erheblich geringeren Leucin-Mengen drastischer auswirkt als in den anderen Kolben.

Eine weitere Steigerung der Leucin-Konzentration (unmarkiert) um das 10-fache konnte den Einbau von ^3H -Leucin nicht verbessern. In den Rohextrakten lag die Aktivität sogar deutlich unter den Werten für 1 und 2. Außerdem war die PC-Synthese gehemmt, erkennbar an der gelblichen Farbe der Algen, während die Algen aus den Ansätzen 1 und 2 nach 3 Tagen Belichtung sichtbar ergrünt waren. Ebenso zeigte das Spektrum der Rohextrakte einen verringerten PC-Gehalt gegenüber den beiden anderen Proben. Der unangenehme Geruch dieses Algenansatzes ebenso wie der Verlust an Radioaktivität nach Gefriertrocknung (Tab. 7) deuten daraufhin, daß bei zu hoher Leucinkonzentration eine Metabolisierung in flüchtige Verbindungen erfolgt.

7.2 Inkubation mit Lävulinsäure und ^3H -Leucin

Heterotroph gezogene Algen wurden, wie unter 6.2 beschrieben, mit LA behandelt und gleichzeitig mit ^3H -Leucin inkubiert. Zu 100 ml Algensuspension wurde ^3H -Leucin mit einer Gesamtaktivität von 50 μCi ($\hat{=}$ 0.45 nMol) plus 10 μMol kaltes Leucin steril filtriert. Ein Parallelansatz ohne LA wurde mit der gleichen Menge Leucin behandelt. Nach 72 h Belichtung wurden die Zellen geerntet. Die Radioaktivität im Medium hatte um ca. 30 % abgenommen, wobei offensichtlich bereits nach 24 h die Aufnahme an ^3H -Leucin beendet war, die cpm im Medium konstant blieben. Die Algen wurden aufgearbeitet und die lyophilisierten Rohextrakte in je 3 ml PBS gelöst. Die Radioaktivitätsbilanz ist in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Radioaktivitätsbilanz im Verlauf der Aufarbeitung von unbehandelten und LA-behandelten Algen;
cpm $\times 10^6$.

	- LA	+ LA
Medium, sofort nach Zugabe (1000 ml)	56.1	56.0
Medium, nach 72 h	37.9	39.3
aufgebrochene Algen vor UZ (25 ml)	12.7	11.1
Algenrohextrakt nach UZ (25 ml)	6.8	5.1
Lyophilisierter Rohextrakt in 3 ml PBS	2.5	3.0

Immunpräzipitate aus den beiden Rohextrakten wurden in einer anschließenden SDS-Elektrophorese aufgetrennt. Die Menge der aufgetragenen Proben wurde so gewählt, daß beide annähernd die gleiche Aktivität besaßen (~ 12000 cpm). Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel wie üblich gefärbt und entfärbt. Anschließend wurden mit einer Rasierklinge die Bahnen mit den aufgetrennten Immunpräzipitaten längs herausgeschnitten, quer in 8 Stücke geteilt und in diesen die Radioaktivität bestimmt.

Dazu wurden die Gelstücke auf Szintillationsgläschen verteilt, bei 60°C vollständig getrocknet und anschließend mit je 100 μl Wasser gequollen. Auf diese Weise war der Wasseranteil in allen Proben gleich. Nachdem die Gelstücke vollständig gequollen waren, wurde die Szintillationsflüssigkeit zugegeben. Unter dem Einfluß der Szintillationsflüssigkeit änderten die vorher mit Coomassie-Blau angefärbten Proteinbanden ihre Farbe nach Rot. Außerdem quollen die Gelstücke innerhalb eines Tages auf das 2 - 3-fache ihrer vorherigen Größe. Die Proben wurden bis zur cpm-Konstanz gezählt, was nach 6 - 7 Tagen der Fall war. Während dieser Zeit hatte sich die rote Farbe (farbgebundenes Protein) aus den Gelen gelöst und an Hand eines mitgeführten Kontrollwertes (gefärbtes Gelstück + definierter cpm-Menge im Vergleich zu farblosem Gelstück + definierter cpm-Menge) konnte ein gewisser Quench-Effekt der roten Farbe festgestellt werden. Da die Intensität der Färbung nicht in allen Proben gleich war, wurde für jede Probe einzeln durch Zugabe definierter cpm-Mengen die Quench-Rate bestimmt und die Werte entsprechend korrigiert. Die Messung der Extinktionen der einzelnen Lösungen bei 480 nm (Maximum) ergab keine lineare Abhängigkeit der Quench-Rate vom Extinktionswert.

Die Verteilung der Radioaktivität in den eluierten Gelen zeigt Abb. 17. Für die Zuordnung der Gelabschnitte zum unzerteilten Gel vergl. Abb. 18.

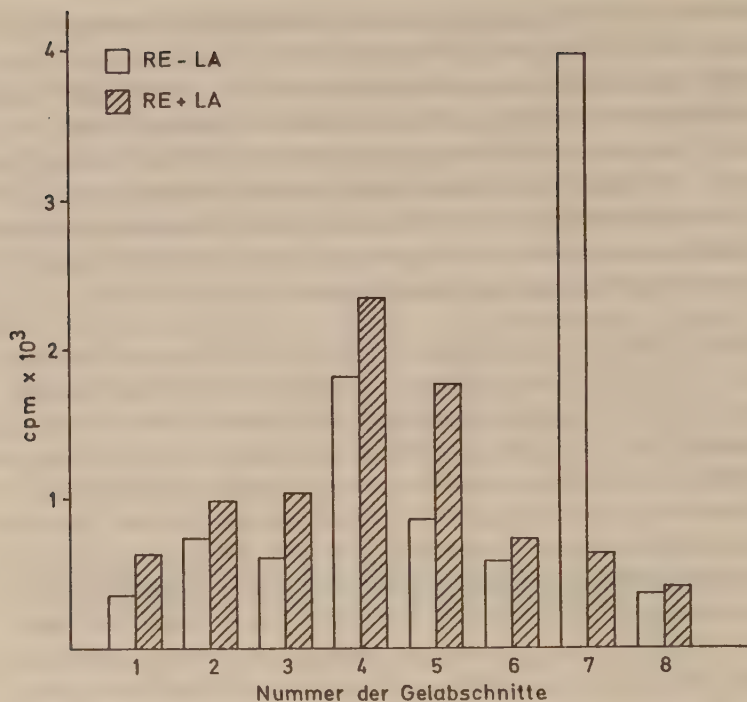


Abb. 17: Verteilung der Radioaktivität in eluierten SDS-Gelen nach Auftrennung von Immunpräzipitaten aus Rohextrakten unbehandelter und LA-behandelter Algen (^3H -Leucin markiert).
Aufgetragene Proteinmenge: - LA 200 μg , + LA 150 μg
Gesamtaktivität in beiden Proben je ~ 12000 cpm
Für die Zuordnung der Fraktionen 1 - 8 zu entsprechenden Gelabschnitten vergl. Abb. 18.

In einem parallelen Versuch wurde das Gel nach dem Entfärben mit DMSO entwässert, in einer Lösung von PPO (2,5-Diphenyloxazol) in DMSO (Dimethylsulfoxid) inkubiert und anschließend im Vakuum getrocknet. Die Vakuumtrocknung auf kräftigem Filterpapier ist die beste Methode zur Haltbarmachung von SDS-Plattengelen. Eine gewisse Einschränkung

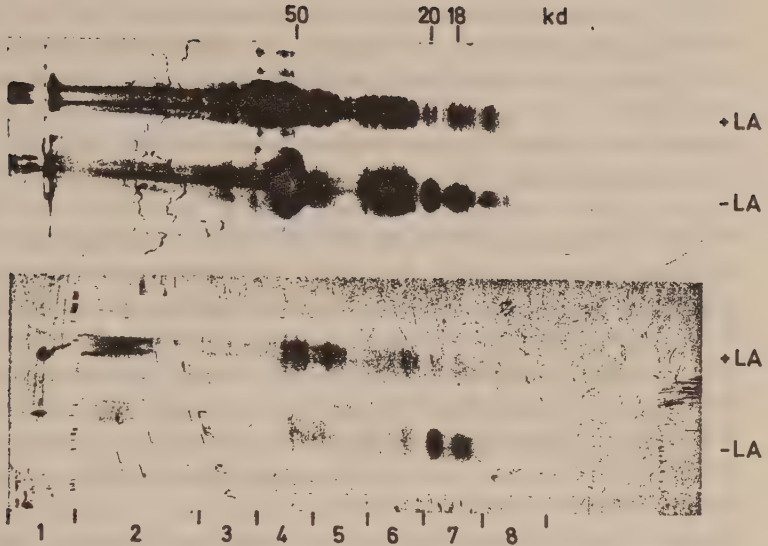


Abb. 18: Autoradiographie der ³H-markierten Proteine nach Auftrennung der Immunpräzipitate aus Rohextrakten von unbehandelten und LA-behandelten Algen in der SDS-Elektrophorese (oben Coomassie-Blau-Anfärbung). Aufgetragene Proteinmenge: - LA 180 µg, + LA 100 µg Gesamtaktivität in beiden Proben je ~28000 cpm.

gilt für Gradienten-Gele. Durch die unterschiedliche Acrylamidkonzentration ist das Gel nach dem Entfärben ungleichmäßig gequollen. Durch die Fixierung des Gels auf dem Filterpapier während des Wasserentzugs entstehen in den Bereichen höherer Acrylamidkonzentrationen Risse, die das Gel im Extremfall für eine Dokumentation unbrauchbar machen. Teilt man das Gel, sind die Spannungen nicht mehr so groß und es kommt höchstens zu kleinen Rissen am unteren Rand des Gels.

Unter Lichtausschluß wurde ein Röntgenfilm auf das Gel gebracht und 8 Wochen im Dunkeln belassen. Durch die Inkubation in der Szintillationsflüssigkeit PPO wird die radioaktive Strahlung der markierten Proteine im Gel verstärkt und zusätzlich sollte der lange Kontakt mit dem Film ein möglichst deutliches Ergebnis gewährleisten.

An den Stellen, an denen im Gel radioaktiv markierte Proteine auftraten, zeigte der Film nach Entwicklung geschwärzte Banden. In dem Ansatz ohne LA (ungehinderte PC-Synthese) trat die Markierung, wie erwartet, vorwiegend in den Banden der α - und β -Untereinheiten von PC auf (Abb. 18). Der Vergleich mit den Ergebnissen der Aktivitätsbestimmung im eluierten Gel (Abb. 17) zeigt ebenfalls in diesem Bereich die höchste Aktivität. Zusätzlich tritt im Bereich höhermolekularer Proteine radioaktive Markierung auf, die auf dem Film allerdings nur als verwischter Schatten zu erkennen ist, doch könnte die Ursache dafür in der Unempfindlichkeit des Films gegenüber geringeren Aktivitäten liegen.

Bei Hemmung der Chromophorsynthese durch LA findet sich die stärkste Markierung in 3 Proteinbanden, die einem Molekulargewicht von 50 - 52 kD entsprechen, außerdem schwache Markierung bei ~ 25 kD sowie im Untereinheitenbereich.

7.3 Schlußfolgerungen

Das Auftreten der Hauptmarkierung bei 50 - 52 kD legt den Schluß nahe, daß unter LA-Einfluß eine lange Proteinkette ("Apoprotein") synthetisiert wird, in der die α - und β -Untereinheit noch nicht getrennt sind. Diese Erklärung steht jedoch im Widerspruch zu bereits früher im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Befunden. So deuteten die Ergeb-

nisse der SDS-Elektrophorese von Immunpräzipitaten aus Rohextrakten LA-behandelter Algen (vergl. 6.7) auf das Auftreten von "Apoprotein" im Untereinheitenbereich hin.

Diese Befunde werden durch Ergebnisse bestätigt, die Steinmüller et al. (1982) in jüngster Zeit präsentierten. Sie wiesen mit Hilfe von Antikörpern nach, daß unter den Translationsprodukten der Poly A⁻-RNA aus *C. caldarium* die beiden Untereinheiten des PC in ihrer authentischen Länge enthalten sind. Der Nachweis wurde mittels SDS-Elektrophorese der Immunpräzipitate aus den radioaktiv markierten Translationsprodukten geführt. Das bedeutet, daß die Untereinheiten nicht als größere "precursor" im Cytosol, sondern in ihrer endgültigen Länge vermutlich vom Plastom kodiert im Chloroplasten synthetisiert werden.

Über die Ursachen für das Auftreten radioaktiv markierter hochmolekularer Proteine nach LA-Behandlung können bisher nur Überlegungen angestellt werden.

Die Möglichkeit einer Aggregation mehrerer niedermolekularer Polypeptide kann ausgeschlossen werden, da die Proben vor dem Auftragen auf das Elektrophorese-Gel zur Dissoziation in Probenpuffer erhitzt worden waren, der reduzierendes Mercaptoethanol enthielt (Disulfidbrücken). Unter der Annahme, daß das eingesetzte Antiserum nicht spezifisch gegen PC, sondern möglicherweise zusätzlich gegen farblose Proteine, wie sie in Phycobilisomen vorkommen, gerichtet ist, wäre das Auftreten solcher höhermolekularer Proteine in den Immunpräzipitaten erklärbar. Für die Immunisierung der Kaninchen wurde PC verwendet, das mit Hilfe von SDS-Elektrophoresen auf seine Reinheit geprüft worden war. Außer den beiden Untereinheitenbanden waren keine Fremdproteine zu erkennen, aber möglicherweise waren höhermolekulare Proteine in Spuren vorhanden,

gegen die ebenfalls Antikörper gebildet wurden. Nach Coomassie-Anfärbung der aufgetrennten Immunpräzipitate wären diese Proteine demnach von der Bande der großen Untereinheit der Immunglobuline (MG 50 kD) verdeckt gewesen.

Es handelt sich bei diesen Proteinen jedenfalls um solche, die auch ohne LA-Einfluß während der Ergrünungsphase der Algen gebildet werden, da die Markierung ebenfalls in der Kontrolle ohne LA, wenn auch nur schwach, zu sehen ist.

Der PC-Gehalt in den eingesetzten Rohextrakten lag bei 35 : 1 (E_{620} in den Absorptionsspektren) für RE - LA : RE + LA, während der Gesamtproteingehalt in den α - und β -Untereinheiten von PC (gemessen als Aktivität nach Markierung mit ^3H -Leucin) lediglich ein Verhältnis von 5 : 1 ($\cong$ 35 : 7) für RE - LA : RE + LA aufwies. Das bedeutet zum einen, daß unter LA-Einfluß weniger Protein synthetisiert wurde als in der Kontrolle, denn bei gleicher Synthese wäre die Markierungsrate 1 : 1. Zum anderen sollten, wenn man den Chromophorgehalt zugrunde legt, unter LA-Einfluß auf 35 Teile PC-Protein (ohne LA gebildet) nur 1 Teil PC-Protein synthetisiert werden, tatsächlich findet man im Untereinheitenbereich 7 Teile, d.h. die Differenz von 6 Teilen wäre demnach farblosem "Apoprotein" zuzuordnen.

Gut vergleichbar damit sind die unter 6.4 und 6.5 erhaltenen Ergebnisse. Dort wurde gefunden, daß bei einem PC-Gehalt von $\sim 30\%$ im Vergleich zu dem der Kontrolle maximale Präzipitation erfolgt, d.h. das Verhältnis PC : "Apoprotein" lag dort bei etwa 1 : 2, die Bestimmung des Chromophor-Protein-Verhältnisses in Immunpräzipitaten ergab ein Verhältnis PC : "Apoprotein" von 1 : 2.5.

8. Einbau von ^{14}C -Häm als Chromophorvorstufe

Wie Brown et al. (1981) durch Markierungsversuche zeigen konnten, läuft die Biosynthese des Phycocyanobilin-Chromophors in *C. caldarium* mit großer Wahrscheinlichkeit über Häm als direkter Vorstufe (siehe Abb. 2). Dieser Befund bildete die Grundlage zu folgender Überlegung:

Wurde in *C. caldarium*-Zellen die Chromophorsynthese durch LA blockiert, mit anderen Worten, ist "Apoprotein" gebildet worden, das wenigstens einen Teil freier Chromophorbindungsstellen besitzt, sollte man erwarten, daß bei Zugabe einer direkten Chromophorvorstufe, wie Häm sie ja offensichtlich darstellt, gezielter Einbau in das "Apoprotein" zum Phycocyanin stattfindet. Verwendet man eine radioaktiv markierte Vorstufe, läßt sich die Einbaurate mit Hilfe der spezifischen Aktivität in der Ausgangssubstanz (^{14}C -Häm) und im Endprodukt (Chromophor im PC) bestimmen. Verglichen mit unbehandelten Algen, die normal PC produzieren, sollte die spezifische Aktivität im Chromophor nach LA-Behandlung deutlich höher liegen, da im ersten Fall lediglich mit einer geringen Markierung infolge Neusynthese von PC während der Inkubationszeit zu rechnen ist.

Die Algen wurden wie gewohnt angezogen, eine Hälfte mit LA, die andere Hälfte als Kontrolle ohne LA. Beide Ansätze waren 72 h belichtet worden. Da Häm bei einem pH von 2.3, bei dem die Algen optimal wachsen, unlöslich ist, wurden die Algen für den Zeitraum der Inkubation mit Häm in Medium pH 8.0 überführt. Eine Lösung von ^{14}C -Häminchlorid in Natronlauge wurde zur Algensuspension gegeben und diese im Dunkeln geschüttelt. Nach 3 1/4 h zeigte das nur noch schwach braun gefärbte Medium, daß die Häm-Aufnahme in die Zellen erfolgt war.

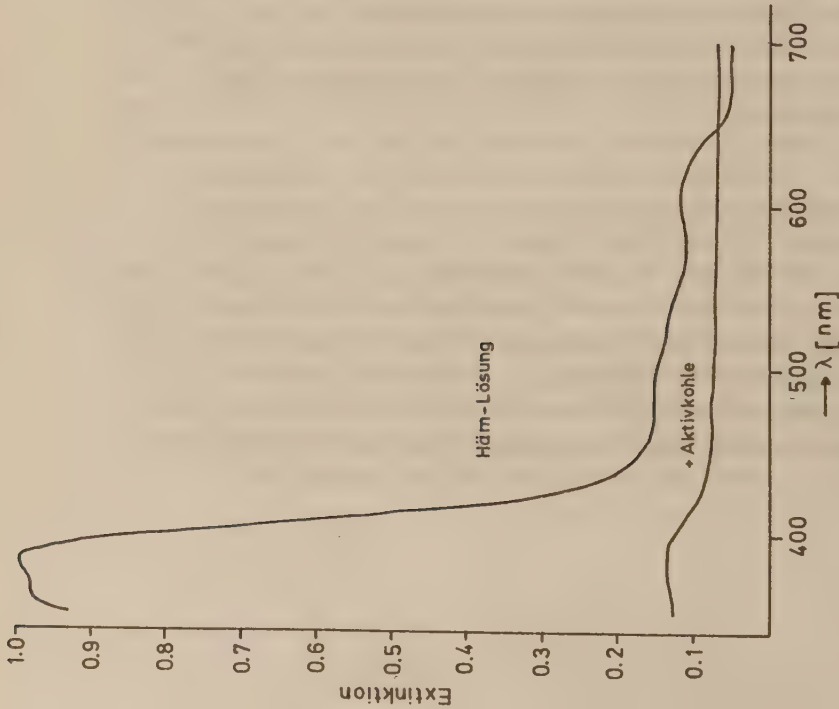


Abb. 19: Häm-Lösung vor und nach Behandlung mit Aktivkohle (1 h).

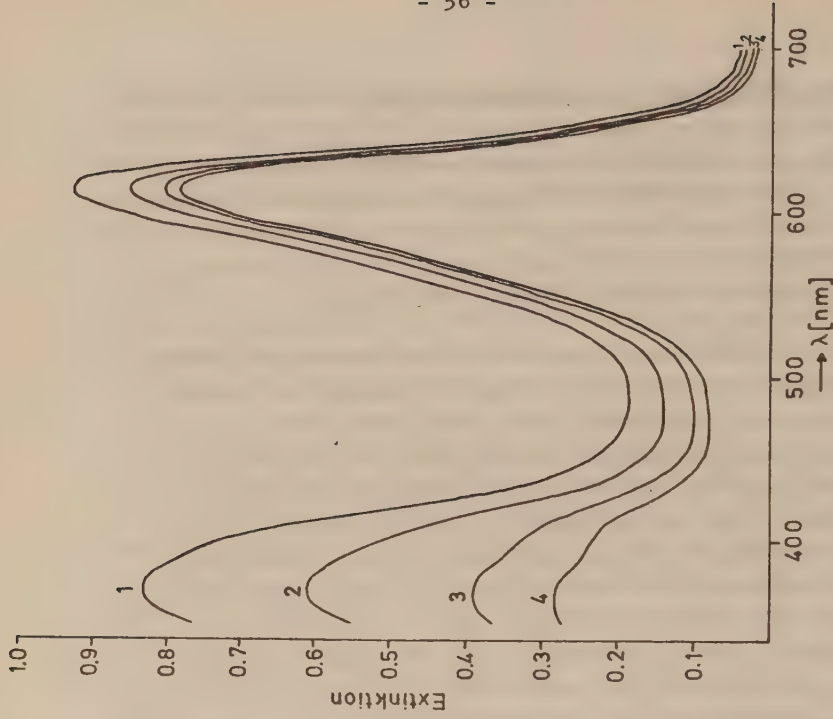


Abb. 20: Abnahme des Hämgehalts in einer Lösung aus PC und Häm nach Inkubation mit Aktivkohle; 1 = 0 min, 2 = 10 min, 3 = 30 min, 4 = 60 min.

Nach Brown et al. (1981) erfolgt keine Adsorption des Häm an die Oberfläche der Zellen.

Anschließend wurden die Algen, wieder in saurem Medium, belichtet und nach 0.5, 3.5 und 16.5 h jeweils Aliquote von 100 ml geerntet. Die daraus gewonnenen Rohextrakte wurden nach der Ultrazentrifugation mit PC-haltigem, unmarkiertem Rohextrakt versetzt, um für die nachfolgenden Versuche prozentual höhere Ausbeuten an radioaktiv markierten Verbindungen zu gewährleisten.

Um zu vermeiden, daß gelöstes bzw. an Proteine angelagertes, aber nicht in Chromophor eingebautes Häm die Radioaktivitätsmessung beeinflusst, wurden die Rohextrakte mit Aktivkohle versetzt und nach 1.5 h wieder abzentrifugiert. In einem Vorversuch konnte sichergestellt werden, daß fast ausschließlich Häm adsorbiert wird und nur in vernachlässigbarer Menge PC bindet (Abb. 19, 20). Tatsächlich war die Aktivität im Rohextrakt nach dieser Behandlung deutlich vermindert.

Nach Ammonsulfatfällung und Dialyse wurden Aliquote der Rohextraktlösungen immunpräzipitiert, um von anderen Rohextraktproteinen abzutrennen und in den Präzipitaten die cpm bestimmt. Die spezifische Aktivität errechnete sich aus dem Chromophorgehalt bezogen auf die Gesamtmenge nach Dialyse unter Berücksichtigung des nachträglich zugesetzten unmarkierten PC (Tab. 9).

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, ergibt sich für die LA-behandelten Proben in den Präzipitaten eine höhere spezifische Aktivität in Bezug auf den Chromophor als sie das eingesetzte Häm besaß. Die Ursachen dafür sind vermutlich z.T. experimenteller Art. Da die Präzipitation nicht quantitativ erfolgt war (es wurde wegen der großen Menge, die benötigt wurde, einheitlich Anti-PC-Antiserum 3 verwendet, dessen Titer nicht so hoch war, vergl. Kap. 4),

Tab. 9: Einbau von ^{14}C -Häm in Phycocyanobilin in ergründenden Zellen von *Cyanidium caldarium*, in denen die Tetrapyrrolsynthese durch Lävulinsäure gehemmt wurde. Messung der Aktivität von immunpräzipitiertem PC aus den Rohextrakten. Kontrolle ohne LA. Die spezifische Aktivität des eingesetzten Häm betrug 3.1×10^8 cpm/mmol bzw. 3.4×10^8 dpm/mmol.

Inkubationszeit	0.5 h		3.5 h	
	- LA	+ LA	- LA	+ LA
PC im Rohextrakt ^{a)}	256	6	144	27
PC nach Zugabe von Träger-PC ^{a)}	332	295	371	276
PC nach Reinigung ^{a)b)}	251	217	200	226
cpm	7130	10080	2090	12170
PCB im Präzipitat ^{a)}	80	75	60	74
cpm	1657	2449	465	4625
spez. Aktivität cpm $\times 10^6$ /mmol	20.7	32.6	7.8	62.5
spez. Aktivität im ur- sprünglich gebildeten PC in cpm $\times 10^6$ /mmol	27.2	1630	19.4	630

a) in nmol Phycocyanobilin (PCB)

b) einschließlich Aktivkohle, Ammonsulfatfällung und Dialyse

wie am blauen Überstand nach Immunfällung zu sehen war, wurde rechnerisch die Chromophormenge ermittelt, auf die sich die im Präzipitat gemessenen cpm beziehen. Mit Hilfe der Extinktionen der Überstände nach Immunfällung konnten die tatsächlich in den Präzipitaten enthaltenen Chromophormengen und die theoretisch zu erwartenden Werte ermittelt werden. Die Tabelle 9 gibt die Werte für vollständige Immunreaktion an.

Eine weitere Fehlerquelle stellte die teilweise Unlöslichkeit der Präzipitate in SDS dar (für Szintillationszählung). Selbst nach 30-minütigem Kochen der Proben im Wasserbad war nicht alles gelöst. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, daß während des Kochens Wasserverlust bzw. durch Öffnen der Eppendorf-Reaktionsgefäße auch Materialverlust eingetreten war, der eine genaue Aliquotbestimmung nicht mehr zuließ. Die nicht gelösten Proben wurden im Potter homogenisiert und 100 µl davon für die Zählung eingesetzt. Da die gemessenen cpm z.T. nur knapp über dem background des Cocktails lagen, muß auch hier mit einem gewissen Fehler gerechnet werden. Alle diese Faktoren könnten sich in der genannten Weise auf das Ergebnis auswirken. Nicht zuletzt ein Unsicherheitsfaktor von entscheidender Bedeutung ist die Bestimmung des ursprünglichen PC-Gehalts in den Rohextrakten mit Hilfe der Absorption bei 620 nm. In den LA-behandelten Proben, besonders nach 0.5 h, war der Gehalt derart gering, daß die PC-Bestimmung sicherlich mit einem großen Fehler behaftet ist, der in der Berechnung der spezifischen Aktivität zum Ausdruck kommt. Möglicherweise enthalten auch die Immunpräzipitate noch unspezifisch gebundenes Häm, das nicht durch die Aktivkohlebehandlung entfernt werden konnte.

Daraufhin wurden die verbliebenen dialysierten Rohextrakte gefriergetrocknet (0.5 und 3.5 h-Werte) sowie die 16.5 h-

Tab. 10: Einbau von ^{14}C -Häm in Phycocyanobilin in ergrünenden Zellen von *Cyanidium caldarium*, in denen die Tetrapyrrolbiosynthese durch Lävulin säure gehemmt wurde. Messung der Aktivität im abgespaltenen Chromophog. Kontrollen ohne LA. Die spezifische Aktivität des eingesetzten Häm betrug 3.1×10^6 cpm/mmol bzw. 3.4×10^6 dpm/mmol.

Inkubationszeit	0.5 h		3.5 h		16.5 h	
	- LA	+ LA	- LA	+ LA	- LA	+ LA
PC im Rohextrakt ^{a)}	256	6	144	27	359	91
PC nach Zugabe von Träger-PC ^{a)}	332	295	371	276	359	357
PC nach Reinigung ^{a)b)}	251	217	200	226	222	214
cpm	7130	10080	2090	12170	39900	71470
PCB nach HBr-Abspaltung und Veresterung ^{a)}	38 ^{c)}	45 ^{c)}	22 ^{c)}	69 ^{c)}	132	125
PCB nach DC ^{a)}	25	13	4	14	16	14
cpm	23.2	27.2	8.7	31.2	802.0	495.0
spez. Aktivität cpm x 10^6 /mmol	0.93	2.09	2.18	2.23	50.1	35.4
spez. Aktivität cpm x 10^6 /mmol im ursprünglich gebildeten PC	1.2	105.0	5.5	22.3	50.1	138.8
% PCB aus ^{14}C -Häm gebildet	0.39	33.9	1.8	7.2	16.2	44.8

a) in nmol Phycocyanobilin (PCB)

b) einschließlich Aktivkohle, Ammonsulfatfällung, Dialyse

c) es wurden nur Aliquote des Rohextrakts eingesetzt

Probe soweit aufgearbeitet, nachdem sich gezeigt hatte, daß für die bessere Beurteilung der Tendenzen der dritte Wert unerläßlich ist. Aus den lyophilisierten Rohextrakten wurden die PCB-Chromophore mit HBr abgespalten (Brandlmeier, 1981). Nach Veresterung und Dünnschichtchromatographie wurde die PCB-dimethylester-Bande aus der Kieselgel-Platte herausgekratzt und in Methanol eluiert. Um sicher zu gehen, daß das Ergebnis nicht durch mitgeschlepptes Häm verfälscht wird, wurde kaltes Häm der gleichen Behandlung unterzogen und parallel zu jeder Probe mit chromatographiert. Die R_f -Werte von Häm-dimethylester und PCB-dimethylester unterschieden sich jedoch sehr deutlich voneinander (Abb. 21).

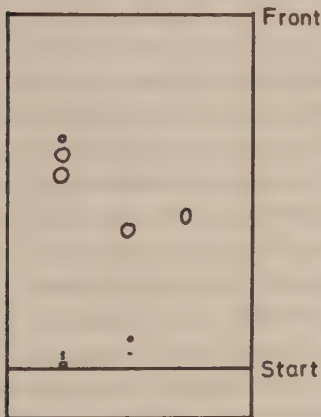


Abb. 21: Dünnschicht-Chromatogramm der Auftrennung von Hämdme, PCBdme und Phytyochromobilindme (von links nach rechts) Laufmittel: CCl_4 :Ethylacetat 1:1

Aus der Chromophormenge (über die Extinktion bestimmt) und den gemessenen cpm wurde die spezifische Aktivität berechnet. Die cpm wurden lediglich um den background korrigiert, da weder durch Methanol noch durch die blaue Eigenfarbe des Chromophors ein Quench (Fluoreszenzlöschung und dadurch geringere Zählausbeute) festgestellt wurde.

Die Daten zu diesem Versuch sind in Tab. 10 zusammengestellt. Es zeigte sich, daß sowohl die Aufnahme als auch der Einbau von Häm jeweils in den LA-behandelten Proben höher war als in den Kontrollen. Selbst nach 16.5 h war dies der Fall, obwohl zu erwarten gewesen wäre, daß sich nach so langer Belichtungszeit die Unterschiede verwischen. In der LA-Probe kann in dieser langen Zeit zusätzlich neu synthetisierter unmarkierter Chromophor eingebaut werden, während in der Kontrolle der Einbau von markiertem Häm in PC mit der gleichen Wahrscheinlichkeit erfolgt wie der Einbau unmarkierter Vorstufen bzw. der erwartete "Vorsprung" im Einbau von ^{14}C -Häm in den LA-Proben verringert sich durch neu gebildetes PC (während 16.5 h), in das im gleichen Maß wie in den unbehandelten Proben markierter und unmarkierter Chromophor eingebaut wird.

Die Bildung von 16.2 % PCB aus ^{14}C -Häm (16.5 h, - LA) ist vergleichbar mit der Einbaurrate, die Brown et al. (1981) nach einer Belichtungszeit von 64 h fanden (~20 %). Der höhere Wert im Fall der LA-behandelten Zellen muß nicht unbedingt eine höhere Einbaurrate bedeuten, sondern ist offensichtlich auf die durch LA bewirkte Verarmung an Porphyrin-Vorstufen zurückzuführen. In diesem Fall wird bevorzugt exogen angebotenes Häm eingebaut. Der extrem hohe Wert für die LA-Probe nach 0.5 h muß wohl auch wieder vor dem Hintergrund der äußerst geringen PC-Menge, die ursprünglich gebildet wurde, betrachtet werden.

Rückschlüsse auf das Vorhandensein von "Apoprotein" in den mit LA vorbehandelten Zellen, in das exogen angebotenes ^{14}C -Häm bevorzugt eingebaut werden sollte, konnten nicht gezogen werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, daß es während der Belichtungszeit zu einer Neusynthese von Protein kommt, in das ^{14}C -Häm eingebaut wird.

9. Auftrennung eines Rohextraktes aus LA-behandelten Algen über DEAE-Cellulose

Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen geht hervor, daß unter dem Einfluß von Lävulinsäure Proteine auftreten, die trotz geringeren Chromophorgehalts immunologisch mit PC kreuzreagieren und deshalb als "Apoprotein(e)" des PC betrachtet werden können. Es wurde nun versucht, aus Rohextrakten LA-behandelter Algen diese(s) Protein(e) abzutrennen und anzureichern.

Unter der Annahme, daß das "Apoprotein" auf Grund der fehlenden Chromophore eine weniger negative Ladung aufweist, als PC (die negativen Ladungen der Chromophore rühren von den Propionsäureseitenketten der Ringe B und C her), sollte es eine geringere Affinität an die Matrix eines Anionenaustauschers aufweisen als PC. Um das "Apoprotein" von PC und anderen Rohextraktproteinen abzutrennen, wurde die Ionenaustausch-Chromatographie unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, die für die Isolierung von PC angewendet wurden (Kufer, 1980). Nach Elution mit einem KCl-Gradienten von 0 - 0.3 M ergab sich folgendes typisches Elutionsdiagramm (Abb. 22). Die Einzelfraktionen wurden zu vier großen Fraktionen vereinigt, wobei versucht wurde, die Hauptmenge an PC mit einem Proteinpeak zu korrelieren und in einer Fraktion zusammenzufassen, was jedoch nicht immer eindeutig möglich war.

In Abb. 24 sind für 7 Trennungen der relative Proteingehalt jeder Fraktion und dazu die Verteilung von PC auf diese Fraktionen dargestellt. Bei Nr. 6 war die Säule offensichtlich überladen, deshalb ergab sich keine befriedigende Auftrennung in abgrenzbare Proteinfractionen (Abb. 23). Die Einteilung wurde entsprechend den Proteinpeaks und der PC-Verteilung vorgenommen (6 Fraktionen: 0 - 5).

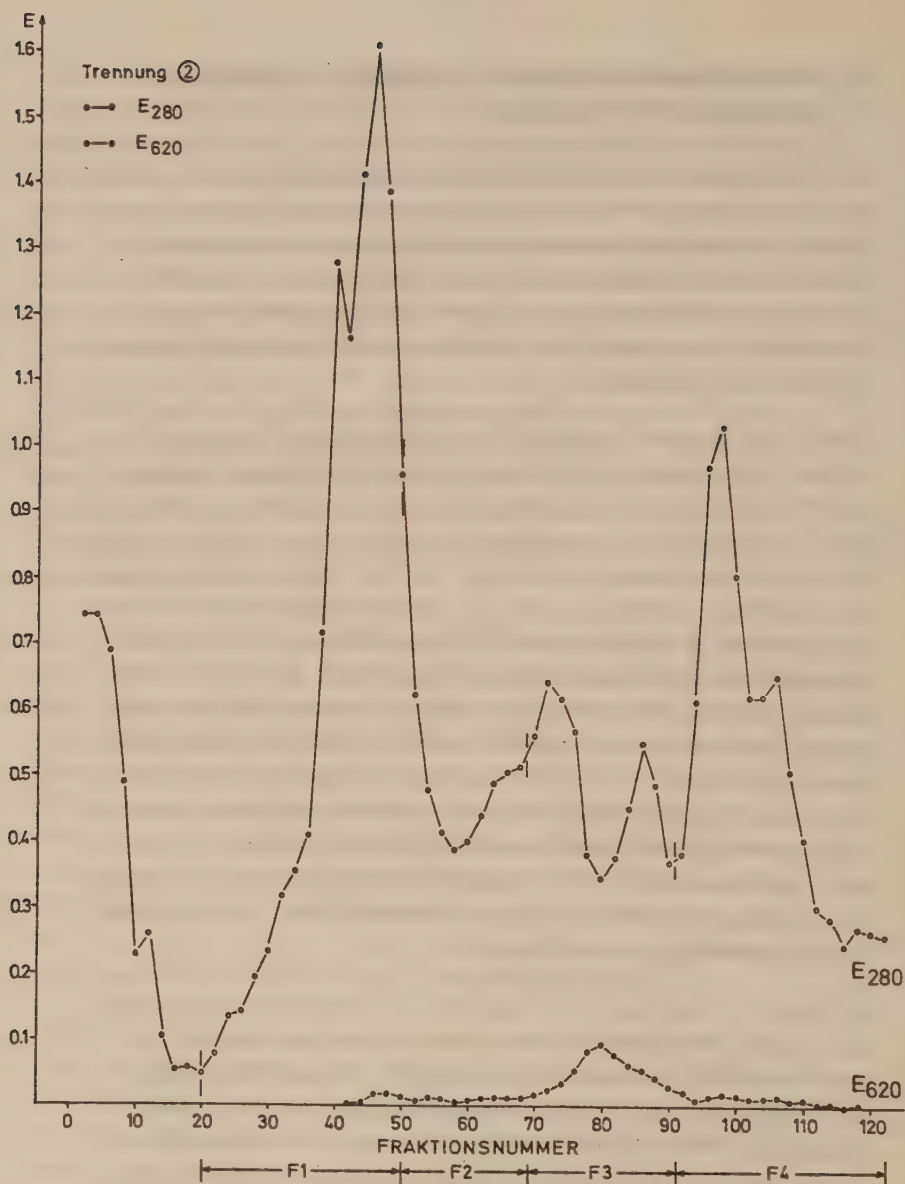


Abb. 22: Elutionsdiagramm nach Auftrennung eines Rohextraktes aus LA-behandelten Algen über DEAE-Cellulose, KCl-Gradient 0 - 0.3 M.

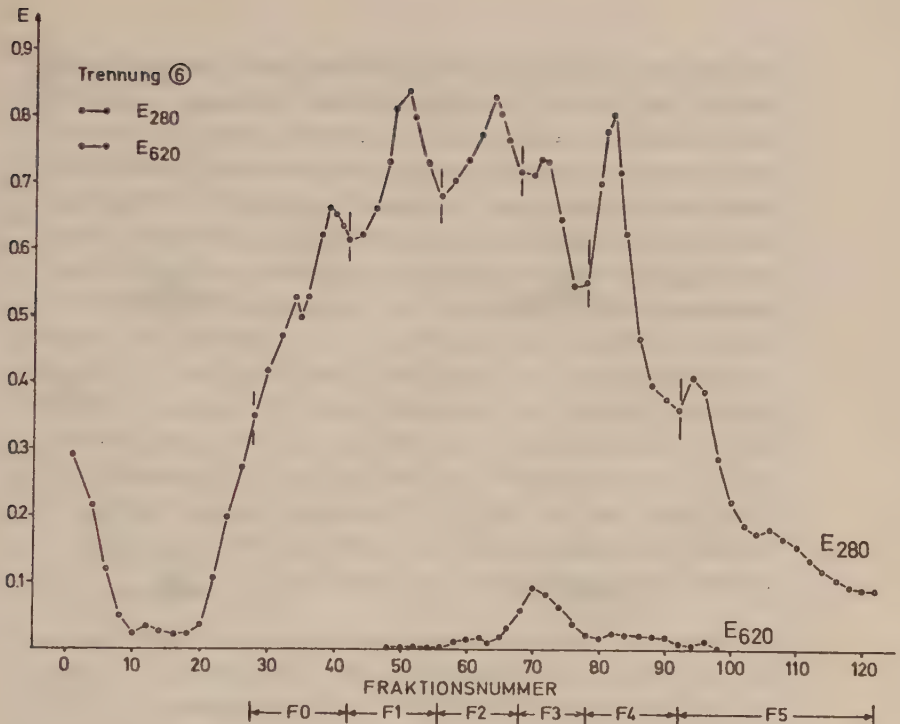


Abb. 23: Elutionsdiagramm nach Auftrennung eines Rohextraktes aus LA-behandelten Algen über DEAE-Cellulose, KCl-Gradient 0 - 0,3 M; Säule offensichtlich überladen.

Bei Trennung Nr. 7 wurde die Fraktionierung nicht streng nach den Proteinmaxima vorgenommen, sondern in Anlehnung an die vorhergegangenen Trennungen die 5 großen Fraktionen nach den Nummern der Einzelfraktionen zusammengefaßt, da das Verteilungsmuster der Proteine nur noch teilweise mit dem früherer Trennungen übereinstimmte. Daraus ergibt sich auch die abweichende PC-Verteilung. In allen anderen Fällen findet sich der Hauptteil an PC in F3, während er im letzten Fall auf F2 konzentriert ist.

Die so erhaltenen Fraktionen wurden nach Gefriertrocknung in PBS gelöst. Aliquote dieser Lösungen wurden auf ihre immunologische Reaktion getestet (Tab. 11). Vergleicht man die Verhältnisse, die sich aus Präzipitatenmenge und eingesetzter PC-Menge ergeben, so findet man für F1 und F2 großen Überschuß an präzipitiertem Protein im Gegensatz zu F3. Vorausgesetzt, daß in F3 nur PC präzipitiert, kann für das Verhältnis Antigen : Antikörper im Präzipitat der Faktor 1 : 9 errechnet werden (für Trennung Nr. 2), was mit Daten, die bei Ovalbumin gefunden wurden, gut übereinstimmt (Feilenberg, 1978). Für die Trennung Nr. 6 ergibt sich nur ein Faktor von 1 : 5. Geht man davon aus, daß diese Fällungsverhältnisse auch für das gesuchte farblose Protein gelten, so läßt sich schließen, daß in F1 und F2 zusätzlich solches Protein ausgefällt worden ist.

Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich auf die F2. In F1 liegt in Relation zu PC möglicherweise mehr von dem gesuchten Protein vor, die Gesamtmenge ist jedoch in F2 größer.

Tab. 11: PC-Gehalt der für die Präzipitation eingesetzten Aliquote und die erhaltenen Präzipitatenmengen für die Fraktionen F1 - F4 der Trennungen Nr. 2 und Nr. 6.

	FO	F1	F2	F3	F4
2) mg PC/100 µl	-	0.003	0.007	0.033	0.010
mg Protein im Präzipitat	-	0.117	0.239	0.334	0.210
6) mg PC/100 µl	-	0.0006	0.006	0.019	0.009
mg Protein im Präzipitat	-	0.014	0.074	0.103	0.011

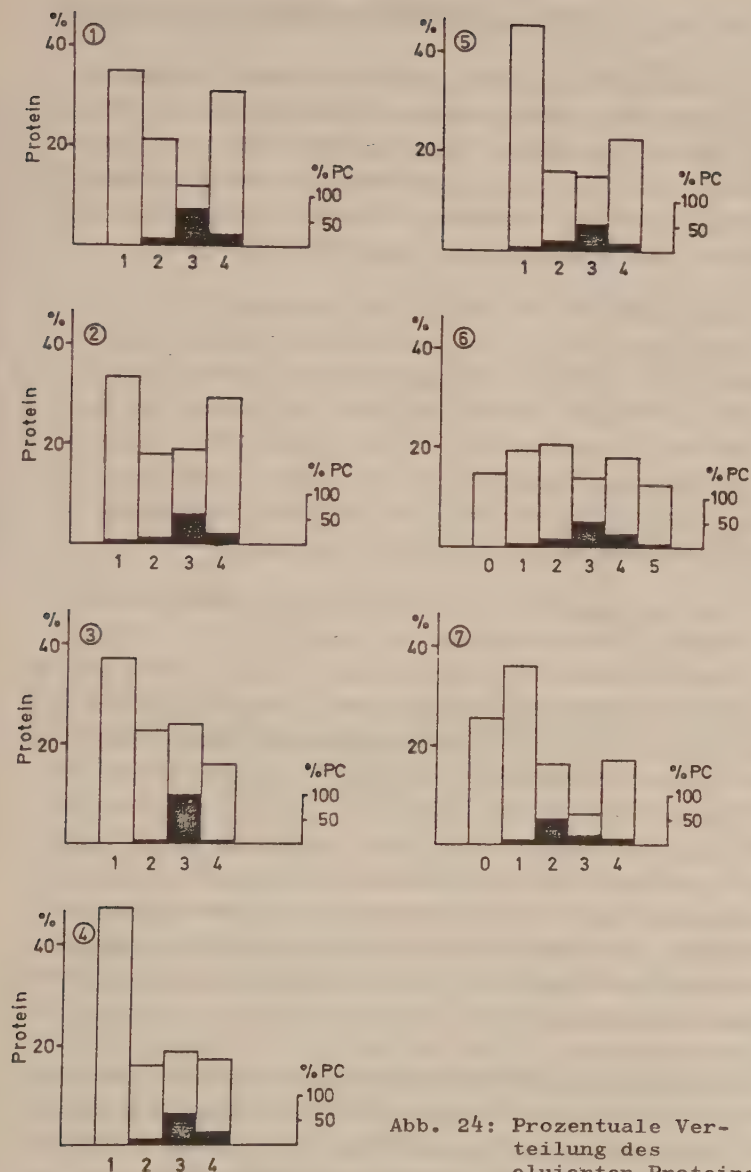


Abb. 24: Prozentuale Verteilung des eluierten Proteins (nach DEAE) auf die

einzelnen Fraktionen; die anteilmäßigen PC-Mengen sind ebenfalls angegeben.

Auftrag: 70 - 120 mg gefriergetrockneter Rohextrakt bei einem Säulenvolumen von 150 ml.

10. Versuch der Bindung von PCB-Chromophor an F2-Protein

Die F2-Fraktion (nach DEAE) enthielt offensichtlich ein Protein, das eine immunologische Kreuzreaktion mit PC zeigt, dem im Unterschied dazu zumindest ein Teil seiner Chromophore fehlt, d.h. es sind möglicherweise Chromophorbindungsstellen vorhanden, aber nicht besetzt. Daraus ergab sich die Grundlage für folgenden Versuch:

Als "Apoprotein" des PC sollte das gefundene Protein eine gewisse Affinität zu exogen angebotenen PCB-Chromophor besitzen, wenn auch im vorliegenden Fall keine Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen Chromophor und Protein erwartet werden durfte (vergl. Seite 73). Sollte eine spezifische Wechselwirkung zwischen beiden Komponenten eintreten, ließe sich das an einer Veränderung im Absorptionsspektrum des Chromophors erkennen.

Freie Gallenfarbstoffe besitzen cyclische Konformation mit starken Absorptionsbanden im nahen UV (350 - 370 nm) und schwachen Banden im langwelligen Bereich (600 - 700 nm je nach Chromophor und Ladung, Kufer, 1980 und Referenzen). Für die gestreckte Konformation des Chromophors, wie sie im nativen Zustand des Proteins vorliegt, gelten die umgekehrten Verhältnisse (Abb. 25). Für den hier durchgeführten Versuch gilt: Tritt der zugesetzte freie Chromophor (cyclisch) mit dem vorgelegten Protein in Wechselwirkung, d.h. paßt sich seine Konformation der Proteinstruktur an und streckt sich, sollte sich dies in einem veränderten Verhältnis der beiden Absorptionsbanden zueinander ausdrücken.

Es wurde isolierter PCB-Chromophor (freie Säure, mit kochendem Methanol aus PC abgespalten, O'Carra und O'hEocha, 1966, modifiziert von Köst, 1974) zu einer Lösung von F2 in neutralem Tris-Puffer gegeben und die Änderung der spektralen Absorption des Chromophors verfolgt. Es trat

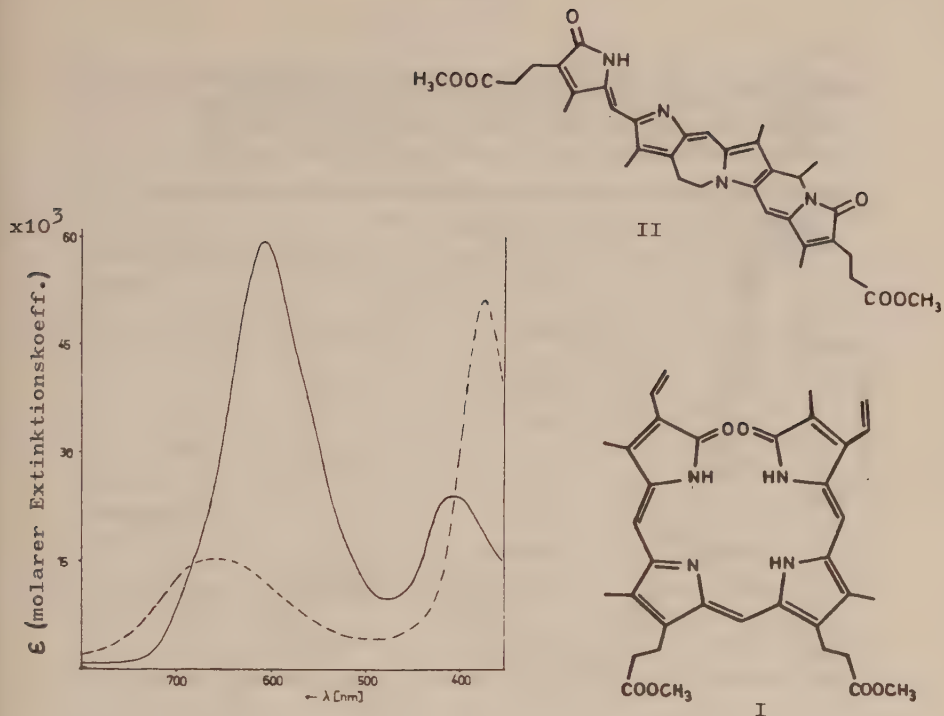


Abb. 25: Charakteristische Absorptionsspektren der Modellsubstanzen für cyclische Konformation (Biliverdindimethylester (I) ----) und gestreckte Konformation (Isophorcabilindimethylester (II) —) in Methanol (Kufer, 1980).

sofort nach Zugabe der Chromophorlösung zur Proteinlösung eine Änderung des Spektrums auf (Abb. 26), die Absorption im nahen UV bei 365 nm nahm zusammen mit der bei 590 nm ab (es trat eine Verschiebung nach 585 nm ein), während aus der Schulter bei 640 nm ein Maximum entstand. Nach 1 h bei Raumtemperatur hatte die Extinktion bei 640 nm noch geringfügig zugenommen; wie Tab. 12 zeigt, blieben die Extinktionsverhältnisse von diesem Zeitpunkt ab unverändert. Die erste Spalte $E_{585} : E_{640}$ gibt an, in welchem Maß sich das Maximum bei 640 nm ausbildete,

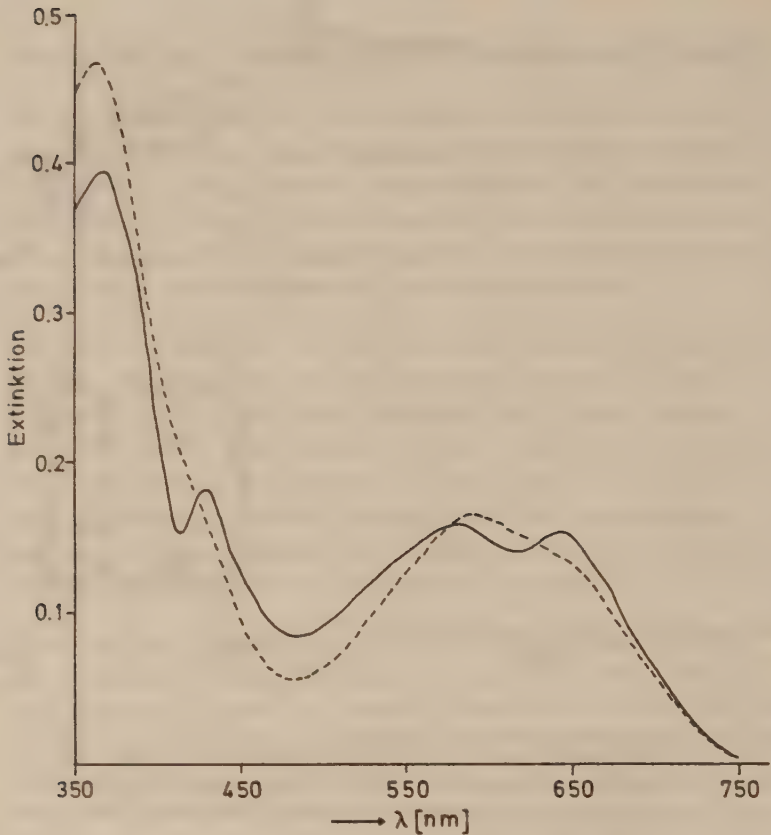


Abb. 26: Veränderung des Absorptionsspektrums von PCB
(----) nach Zugabe zu F2-Protein (—)
nach 60 min.

in der zweiten Spalte $E_{365} : E_{640}$ drücken die abnehmenden Werte die Intensitätsänderung zugunsten der langwelligen Absorption aus, wie es dem Übergang von der cyclischen in die gestreckte Konformation entspräche (Abb. 27). Die theoretisch zu erwartende Umkehrung der Verhältnisse wurde jedoch nicht gefunden.

Tab. 12: Veränderung der Absorptionsmaxima im langwelligen und nahen UV-Bereich nach Zugabe von PCB zu F2-Protein ausgedrückt durch die Extinktionsverhältnisse. Kontrolle: PCB + Rinderserumalbumin (BSA).

		$E_{585} : E_{640}$	$E_{365} : E_{640}$
PCB		1.15	3.50
PCB + F2	0 min	1.04	2.66
	60 min	0.92	2.59
	2 1/4 h	0.93	2.42
	5 1/2 h	0.91	2.54
Kontrolle			
PCB		1.00	3.78
PCB + BSA	0 min	0.96	5.34
	60 min	0.98	5.36

Ausgehend von dem in Kap. 7.2 (S.54) ermittelten Verhältnis zwischen PC- und "Apoprotein"gehalt von 1 : 6 sollte das in dieser F2 enthaltene "Apoprotein" maximal 6 nMol Chromophor binden können, zugesetzt wurden 5 nMol freier Chromophor. Wenn die gesamte eingesetzte Chromophormenge spezifisch mit dem Protein reagiert hätte, wäre eine Zunahme der Extinktion bei 620 nm um 400 % zu erwarten gewesen (vergl. Abb. 27, Absorptionsspektren von nativem und denaturiertem PC; bei diesem reversiblen Vorgang ändern die Chromophore ihre Konformation wie beschrieben). Die beobachtete Zunahme betrug lediglich 15 %, d.h. es kann angenommen werden, daß 4 % des eingesetzten Chromophors spezifisch (Streckung des Chromophors) reagierten. Es trat allerdings eine Verschiebung des erwarteten Maximums nach 640 nm auf. Die bathochrome Verschiebung der absorbierten

Wellenlänge schließt unspezifische Oxidationsreaktionen aus, da in solchen Fällen stets das konjugierte System unterbrochen wird und die Verschiebung dann zu kürzeren Wellenlängen erfolgt. Die Abnahme der Extinktion im nahen UV bei 365 nm um 19 % ist möglicherweise auf eine unspezifische Reaktion zurückzuführen (erwartete Abnahme 44 %, vergl. Abb. 27). Das neu entstandene Maximum bei 430 nm ließe sich mit einer Addition von S-H-Gruppen an C₁₀ des Chromophors (vergl. Abb. 1) erklären.

Im Kontrollversuch mit Rinderserumalbumin (BSA; Protein und Chromophor in gleichen Mengen eingesetzt wie oben) unterschied sich das Differenzspektrum zwischen der anfänglichen Chromophor-Absorption und nach Zugabe zum Protein deutlich von dem mit F2-Protein aufgenommenen (Abb. 28), im wesentlichen kann jedoch nicht von einer spezifischen Änderung der Chromophorstruktur infolge einer Wechselwirkung mit dem "Apoprotein" gesprochen werden.

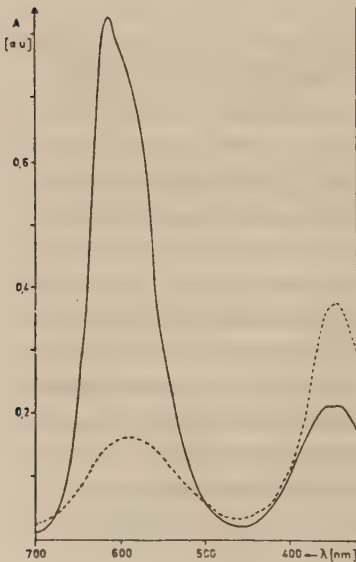


Abb. 27: Absorptionsspektren von nativem (—) und denaturiertem (---) PC. Im nativen Protein besitzen die Chromophore gestreckte, im denaturierten Zustand cyclische Konformation.
(aus Kufer, 1980)

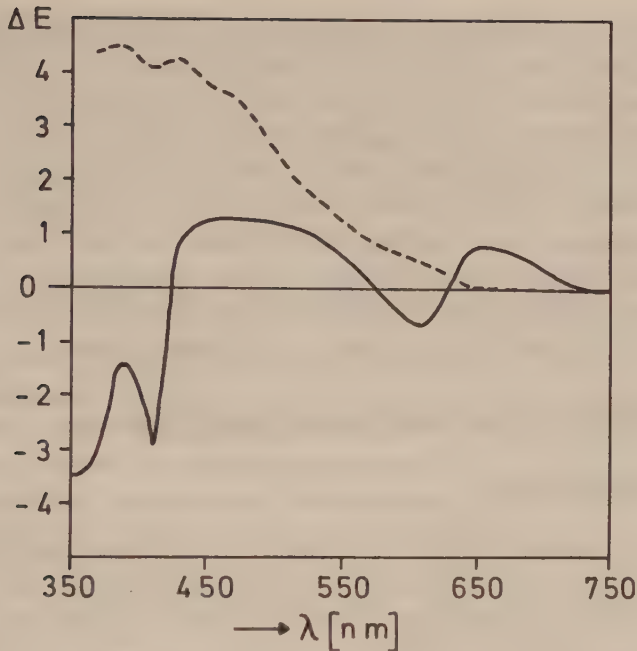


Abb. 28: Differenzspektren der "Reaktion" von freiem PCB-Chromophor mit F2-Protein bzw. mit BSA.
-----: PCB + BSA nach 60 min minus PCB
———: PCB + F2-Protein nach 60 min minus PCB.

Analog der Ankopplung des Chromophors an Apocytochrom c, die vermutlich eine enzymatische Reaktion ist (Fisher et al., 1973; Korb und Neupert, 1978), könnte auch im vorliegenden Fall ein Enzym für die Bindung des Chromophors verantwortlich sein. Eine Erklärung für die unvollständige Reaktion wäre beispielsweise, daß die potentiellen Chromophorbindungsstellen im "Apoprotein" nicht frei zugänglich sind und es erst einer ganzen oder teilweisen Auf-faltung des Proteins bedarf, um an die Bindungsstellen zu gelangen.

Der Versuch, das "Apoprotein" durch Hitze oder Harnstoff vor Zugabe des Chromophors zu entfalten, wurde nicht unternommen, da es keine Möglichkeit gab, zu kontrollieren, inwieweit die Renaturierung des farblosen "Apoproteins" erfolgt. Bei PC kann die erfolgte Renaturierung leicht am Spektrum verfolgt werden (Abb. 27). Im entfalteten Protein werden die Chromophore nicht mehr in ihrer gestreckten Konformation fixiert, sondern gehen in die cyclische Konformation über. Bei Renaturierung des Proteins wird dieser Vorgang wieder rückgängig gemacht.

11. Versuche zur Charakterisierung von F2-Protein

11.1 Immunfixierung

Die durch Dialyse gegen H_2O bidest. + 1 % Glycin entionisierte F2 wurde nach isoelektrischer Fokussierung, bei der noch eine Reihe von Proteinbanden auftrat, der Immunfixierung unterzogen (Abb. 29).

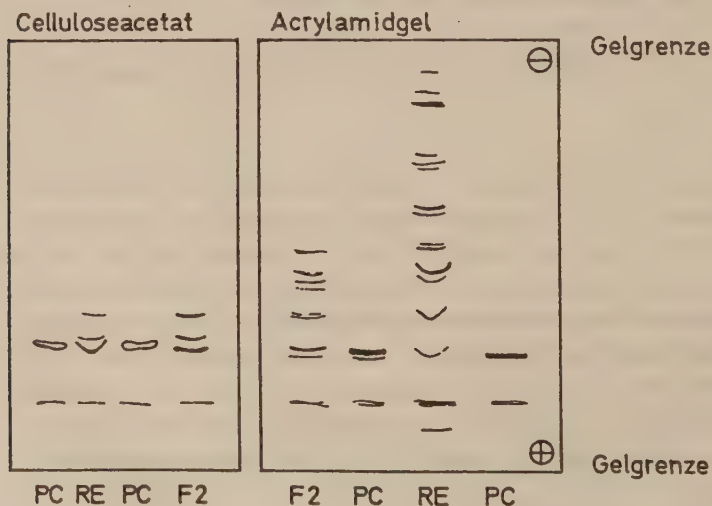


Abb. 29: Isoelektrische Fokussierung und anschließende Immunfixierung von PC, RE + LA und F2 im pH-Gradienten 4 - 6.
Acrylamid ohne Immunfixierung
Celluloseacetat mit Immunfixierung

Im Vergleich zu Proben aus PC wies F2 zusätzliche Präzipitationsbanden bei basischerem pH auf. Der gleichzeitig aufgetragene RE + LA zeigte in demselben Bereich Spuren einer Präzipitation. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Befunden unter 5.3. Dort lieferten Rohextrakte unbehandelter Algen nach Immunfixierung ähnliche Muster in diesem Bereich (pH 5 - 6).

11.2 Zweidimensionale Immunelektrophorese

Mit dieser Methode lassen sich in einem Proteingemisch Komponenten nachweisen, die mit bestimmten Antisera immunologisch reagieren. Dazu wird das Proteingemisch in der ersten Dimension durch Elektrophorese oder isoelektrische Fokussierung aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine, wiederum durch Elektrophorese, im rechten Winkel zur ursprünglichen Laufrichtung in ein antikörperhaltiges Agarose-Gel hineinbewegt (2. Dimension). Dort, wo antigene Proteine wandern, bilden sich Präzipitationslinien. Die auftretenden Muster lassen sich zwei Grundtypen zuordnen:

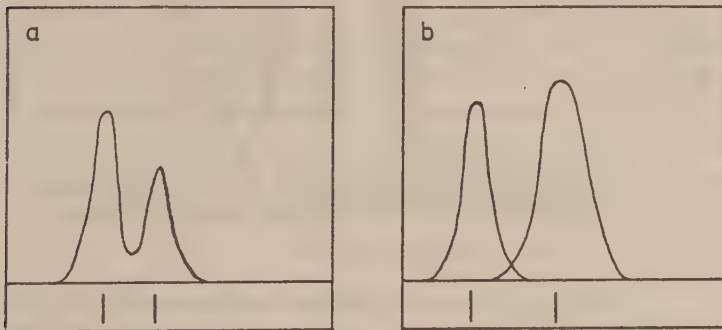


Abb. 30: Präzipitationsmuster bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese (1. Dimension Elektrophorese oder isoelektrische Fokussierung). Erklärung siehe Text.

Abb. 30a zeigt Proteine, die einen unterschiedlichen IEP oder verschiedene Mobilität im elektrischen Feld besitzen, immunologisch aber identisch sind, wie die fusionierenden Präzipitationslinien zeigen. In Fall b dagegen sind die beiden Proteine völlig unabhängig voneinander, d.h. immunologisch nicht verwandt, was die sich kreuzenden Präzipitationslinien ausdrücken.

Eine Variation der eben beschriebenen Immunelektrophorese ist die Tandem-Technik. Zur Identifikation einzelner Antigene in einem Proteingemisch führt man eine gleichzeitige Elektrophorese von Antigengemisch (1) und bekannter Referenzprobe (2) durch (1. Dimension) (Abb. 31). Alle übrigen Schritte erfolgen wie oben beschrieben.

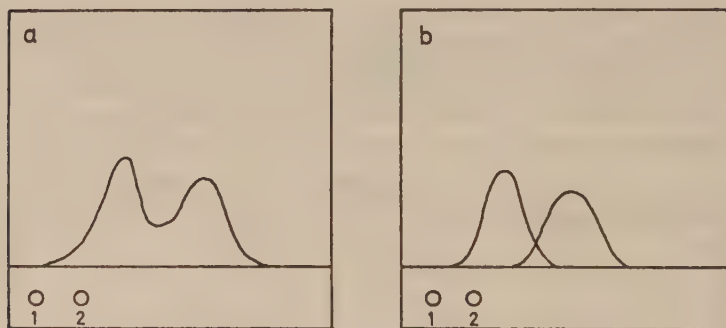


Abb. 31: Präzipitationsmuster bei der Tandem-Immunelektrophorese. Erklärung siehe Text.

Die Interpretation der Präzipitate erfolgt nach dem oben erwähnten Schema. Der Unterschied zur vorhergehenden Technik besteht darin, daß im letzteren Fall das Referenzantigen hinsichtlich Reaktion und evtl. auch Konzentration bekannt ist und sich daraus einige Schlüsse für das unbekannte Protein ziehen lassen.

Alle Immunelektrophoresen werden unter Bedingungen durchgeführt, bei denen praktisch keine Wanderung der Antikörper im elektrischen Feld erfolgt. Der verwendete Puffer liegt mit seinem pH von 8.6 in der Nähe des isoelektrischen Punktes der γ -Globuline (Antikörper) und dadurch ist deren elektrophoretische Mobilität sehr gering. Da es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, beträgt die Laufzeit für die Elektrophorese der 2. Dimension 15 - 18 h.

Mit F2 wurden Tandem-Elektrophoresen und Immunelektrophoresen nach isoelektrischer Fokussierung durchgeführt. Die Tandem-Elektrophorese mit PC als Referenzprobe zeigte eindeutig fusionierende Linien (Abb. 32), wobei allerdings nicht ausgeschlossen werden kann, daß noch gewisse Mengen an PC in F2 dieses Präzipitationsmuster verursachen.

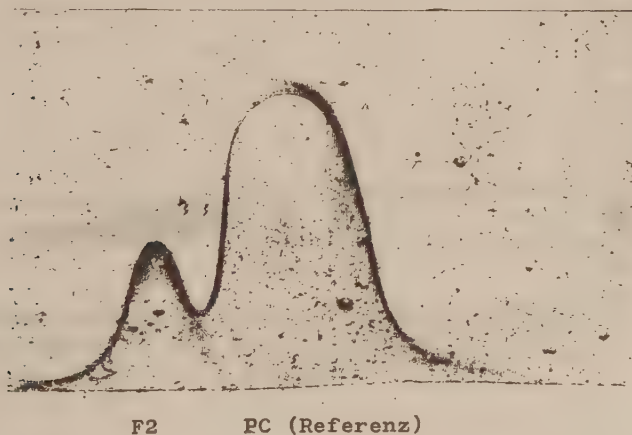


Abb. 32: Tandem-Elektrophorese von PC und F2

Die Ergebnisse nach isoelektrischer Fokussierung in der 1. Dimension bestätigten die Befunde der Immunfixierung von F2 (11.1). Bei F2 traten auch hier wieder bei basischen pH-Werten (in Bezug auf PC) zusätzliche Präzipi-

tationslinien auf, die auf Grund ihrer Fusion untereinander auf immunologische Verwandtschaft schließen lassen (Abb. 33).

Die Fokussierung in der 1. Dimension wurde im Gegensatz zur Elektrophorese der 1. Dimension in Acrylamid-Gelen und nicht in Agarose-Gelen durchgeführt, da die aufgetragenen Proben entweder gar nicht in das Agarose-Gel eindringen oder sich nur eine unbefriedigende Trennung mit verschmierten Banden ergab.

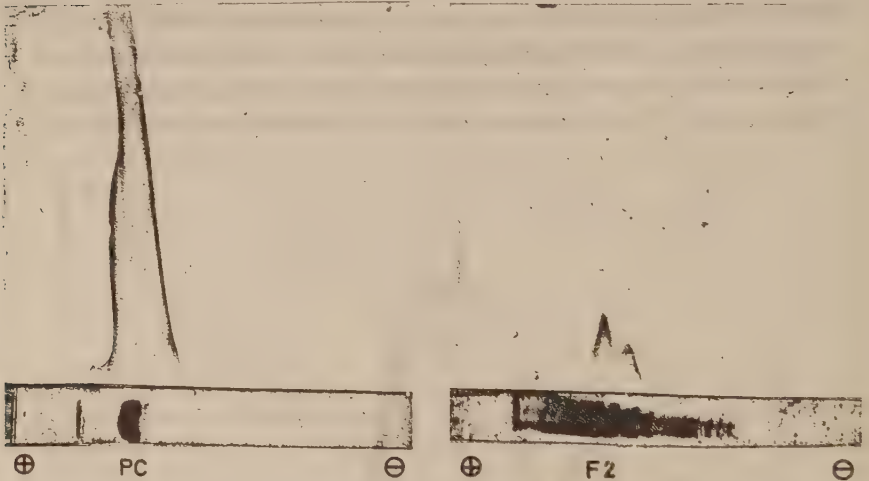


Abb. 33: Zweidimensionale Immunelektrophorese nach isoelektrischer Fokussierung von PC (links) und F2 (rechts). pH-Gradient 4 - 9.

11.3 Präparative isoelektrische Fokussierung von F2

Da bestätigt werden konnte, daß F2 neben PC immunreaktives Protein enthält, wurde versucht, eine weitere Reinigung durch präparative isoelektrische Fokussierung in einem Sephadex G - 200 - Gel in einem pH-Gradienten von 4 - 9

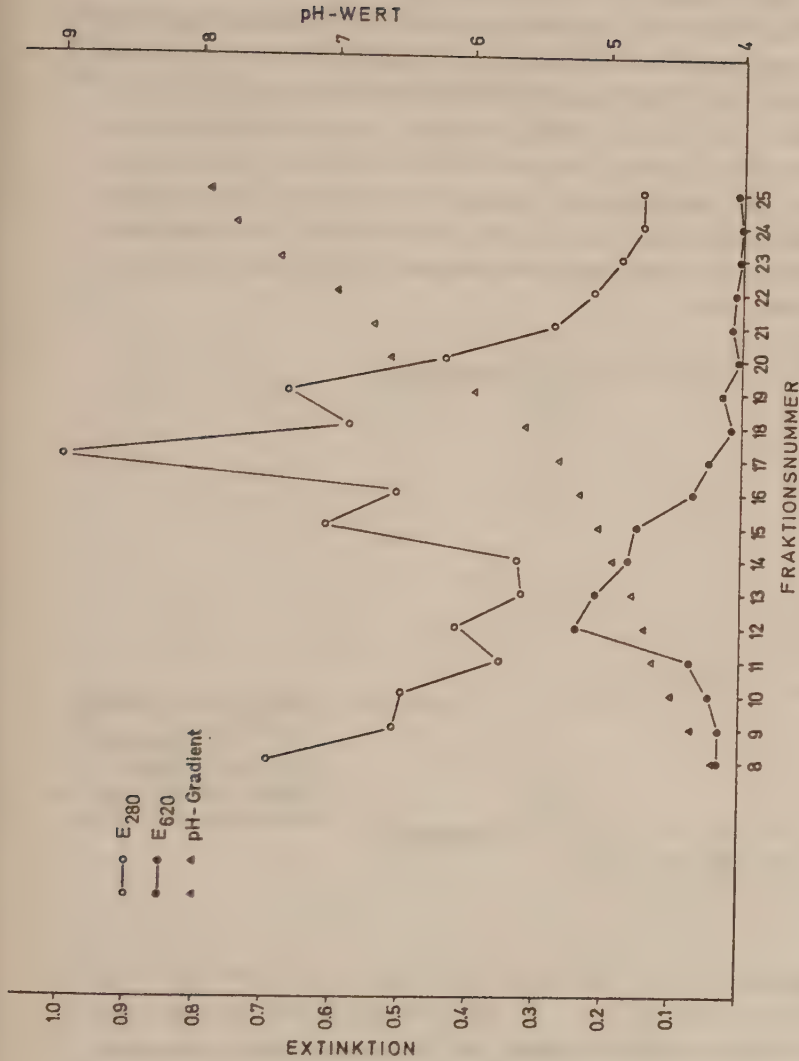


Abb. 34: Auftrennung von F2 durch präparative isoelektrische Fokussierung im pH-Gradienten 4 - 9; Fraktionen in je 3 ml H₂O bidest. eluiert.

zu erzielen. Nach erfolgter Fokussierung wurde in den eluierten (mit H_2O bidest.) Proteinfractionen der pH-Wert bestimmt und die Extinktion bei 620 und 280 nm gemessen (Abb. 34). Fraktion 12 wies die Hauptmenge an PC auf bei einem pH von 4.7. Die Fraktionen 15 - 19 wurden näher untersucht, zum einen wegen ihres hohen Proteingehalts, zum anderen, weil ihre Lage im Gradienten dem Bereich entspricht, in dem nach Immunfixierung und zweidimensionaler Immunelektrophorese die zusätzlichen Banden aufgetreten waren. Die ebenfalls mit diesen 5 Fraktionen durchgeführte Immunfixierung brachte die Bestätigung: in allen Fällen traten in dem genannten Bereich Präzipitationslinien auf (Abb. 35).

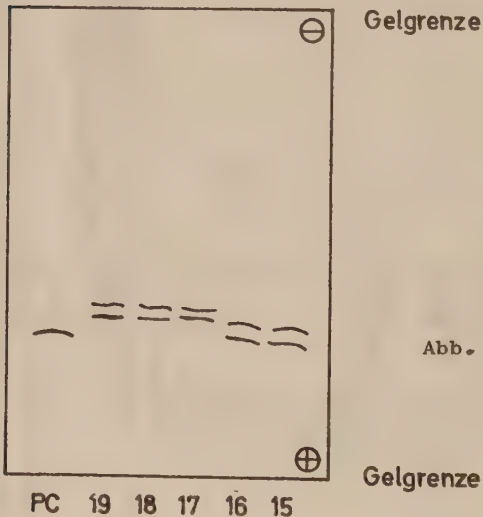


Abb. 35: Immunfixierung der Fraktionen 15 - 19 nach präparativer isoelektrischer Fokussierung von F2; pH-Gradient 4 - 9.

Im Vergleich zur eingesetzten F2 und den Fraktionen 15 und 16 traten bei 17 - 19 keine Banden mehr auf der Höhe der PC-Präzipitationslinie auf. In parallelen Versuchen zeigten sich in diesen Fraktionen manchmal noch schwache

Linien von PC. Durch präparative isoelektrische Fokussierung konnten nahezu PC-freie Proteinfraktionen mit guter Immunreaktivität gegenüber Anti-PC-Antiserum erhalten werden. Die noch in diesen Fraktionen enthaltenen Fremdproteine sollten sich durch wiederholte Fokussierung abtrennen lassen, was jedoch weitaus größere Mengen an Protein erfordert als hier zur Verfügung standen.

C. Zusammenfassung

1. Die Zugabe von 1 % Glucose ins Medium ergrünender *Cyano-
nidium caldarium*-Zellen (Belichtungszeit 7 Tage) ver-
minderte die Gesamtproteinsynthese in dieser Zeit um
etwa 50 %, während die gebildete PC-Menge unter Glu-
cose-Einfluß nur noch 37 % des Kontrollwertes ohne
Glucose erreichte.
2. Durch Immunisierung von 4 Kaninchen mit elektrophore-
tisch reinem PC aus *C. caldarium* wurde Anti-PC-Anti-
serum gewonnen. Der Titer der einzelnen Antiseren
(1 - 4) war unterschiedlich hoch.
3. In Rohextrakten aus ergrünenden Algen (Belichtungs-
zeit 1 - 5 Tage) ließen sich mit Anti-PC-Antiserum
nach 3 bzw. 4 Tagen Belichtungsdauer neben steigen-
den Mengen PC weitere immunaktive Proteine durch Im-
munfixierung nachweisen (im Anschluß an ultradünn-
schicht-isoelektrische Fokussierung, mit der sehr
gute Trennergebnisse erzielt wurden). Diese Proteine
besaßen im Vergleich zu PC (IEP 4.65) einen basi-
schen IEP im Bereich pH 5 - 6.

4. Der mit denselben Rohextrakten durchgeführte Ouchterlony-Doppeldiffusions-Test lieferte keine verwertbaren Ergebnisse, da durch die unterschiedliche Proteinkonzentration in den Rohextrakten die Gefahr von Fehlinterpretationen gegeben war.
5. Die Auftrennung von Immunpräzipitaten aus Rohextrakten von ergrünenden Algen durch SDS-Elektrophorese ergab keine Hinweise auf das Auftreten eines möglichen PC-Apoproteins.
6. Durch Zugabe von Lävulinsäure (Hemmstoff der Chromophorsynthese: kompetitive Hemmung der ALA-Dehydratase) in einer Konzentration von 2 mM bei einer Zelldichte von 4×10^7 Zellen/ml gleichzeitig mit Beginn der Belichtung wurde der PC-Gehalt in den Rohextrakten nach 72 h Belichtung durchschnittlich um den Faktor 27 gegenüber den Kontrollen ohne LA vermindert. Während dieser Zeit nahmen unter LA-Einfluß sowohl die Zelldichte um 10 - 15 % als auch der Anteil an großen (ϕ 2 μ m) Zellen um etwa 50 % ab.
7. In den Rohextrakten aus LA-behandelten Algen konnte, auf den Chromophorgehalt im Rohextrakt bezogen, mit der gleichen Menge Antiserum rund dreimal soviel Protein präzipitiert werden wie aus Rohextrakten von unbehandelten Algen, d.h. unter LA-Einfluß wurde neben PC farbloses Protein gebildet, das ebenfalls mit Anti-PC-Antiserum reagiert ("Apoprotein").
8. Bei Auftrennung von Immunpräzipitaten aus RE - LA sowie RE + LA wanderte das, auf den Chromophorgehalt (in beiden Fällen gleich) bezogene, zusätzlich ausgefällte Protein mit den α - und β -Untereinheiten des PC.
9. Das Präzipitationsverhalten der Proteine in den Rohextrakten aus LA-behandelten Algen beim Ouchterlony-Test

unterschied sich nicht von dem der Proteine in Rohextrakten unbehandelter Algen.

10. Um ^3H -markierte Proteine zu erhalten, wurde ^3H -Leucin ins Medium ergrünender Algen gegeben (0.1 nmol/100 ml). Durch Zugabe von 10 μmol kaltem Leucin wurde unspezifische Adsorption von ^3H -Leucin vermieden; die PC-Synthese verlief ungehindert, während bei einer weiteren Steigerung der Leucin-Konzentration (100 μmol) Hemmung der PC-Synthese sowie Metabolisierung zu flüchtigen Verbindungen eintrat (Aktivitätsverlust in den Rohextrakten nach Gefriertrocknung).
11. Untersuchungen über die Verteilung der Radioaktivität in Polyacrylamid-Gelen (Bestimmung in eluierten Gelen sowie Fluorographie) nach SDS-Elektrophorese von Immunpräzipitaten aus RE - LA und RE + LA ergaben, daß in den Rohextrakten unbehandelter Algen vorwiegend die α - und β -Untereinheiten (18.3 bzw. 19.6 kD) von PC markiert waren neben einer gewissen Aktivität in höhermolekularen Bereichen (~ 25 und 50 kD), während in den Rohextrakten aus LA-behandelten Algen die Markierung hauptsächlich im hochmolekularen Bereich um 50 kD und lediglich Spuren bei etwa 25, 20 und 18 kD erschienen.
12. Bot man Algen, die während 72-stündiger Belichtung mit LA vorbehandelt worden waren sowie Algen, die ohne LA belichtet worden waren, ^{14}C -Häm (als mögliche Vorstufe des PCB-Chromophors) an, ließ sich mit Hilfe der spezifischen Aktivität des eingesetzten Häm bzw. des isolierten PCB-Chromophors eine höhere Aufnahme- und Einbaurate in den Ansätzen mit LA feststellen.
13. Bei der Auftrennung von Rohextrakten aus LA-behandelten Algen über DEAE-Cellulose mit einem KCl-Gradienten von 0 - 0.3 M eluiert vor der PC-Hauptfraktion (~ 0.16 - 0.22 M KCl) eine PC-arme, aber immunaktive Fraktion F2

(~0.11 - 0.17 M KCl). Auch aus dieser F2 konnte, auf Chromophorgehalt bezogen, mehr Protein ("Apoprotein") ausgefällt werden als in der PC-haltigen F3. Bei Immunfixierung von F2 nach isoelektrischer Fokussierung traten zusätzlich zu PC bei pH 5 - 6 Präzipitationsbanden auf.

14. Die Zugabe von freiem PCB-Chromophor zur "Apoprotein"-haltigen F2 wies durch geringe Veränderungen des Absorptionsspektrums des Chromophors auf eine gewisse Affinität bzw. Wechselwirkung des Proteins mit dem Chromophor hin.
15. Die zweidimensionale Immunelektrophorese von F2 konnte die Ergebnisse der Immunfixierung bestätigen. Es traten neben der Präzipitationsbande des PC weitere Proteinbanden auf, die mit dieser fusionierten, was auf immunologische Verwandtschaft der präzipitierten Proteine schließen läßt.
16. Durch präparative isoelektrische Fokussierung von F2 wurden Fraktionen gewonnen, die nahezu kein PC mehr enthielten, aber gute Immunreaktivität gegen Anti-PC-Antiserum besaßen.

D. Experimenteller Teil

1. Anzucht der Algen

Cyanidium caldarium III-D-2 wurde ausschließlich in Flüssigkultur gehalten.

1.1 Nährmedium

Zusammensetzung des Nährmediums (Minimalmedium nach Allen, 1959; modifizierte Vorschrift überlassen von Troxler und Brown):

	Stammlösung M/l	ml Stammlösung/l
H ₂ SO ₄	0.1	10
CaCl ₂	0.1	10
KH ₂ PO ₄	0.2	10
MgSO ₄	0.1	10
NH ₄ Cl	1.0	10
Fe-EDTA		2
Spurenelemente		3

Fe-EDTA-Stammlösung:

1.93 g FeCl₃ x 6 H₂O

2.66 g Na₂EDTA ad 200 ml H₂O

Spurenelemente:	g/l
$\text{Na}_3\text{VO}_4 \times 14 \text{ H}_2\text{O}$	0.028
ZnCl_2	0.034
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0.008
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0.016
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	0.580
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$	1.420
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0.024

Wurden die Algen heterotroph im Dunkeln gezogen, enthielt das Medium 1 % Glucose.

1.2 Kulturbedingungen

Die Kulturgefäße (1l-Fernbachkolben, 300 ml Erlenmeyerkolben) wurden zusammen mit dem Medium in einem Autoklaven (Firma DEUTSCH & NEUMANN, 110 l) 30 min bei 120°C und 1 atü sterilisiert. Die Algen wurden bei $27 - 28^\circ\text{C}$ auf einem Rundschüttler mit 100 UpM gezogen.

Eine Algen-Stammkultur (2×10^8 Zellen/ml) wurde heterotroph im Dunkeln in einem 1l-Fernbachkolben gehalten und alle 2 Monate zu einer Anfangsdichte von 10^7 Zellen/ml überimpft. Aus dieser Kultur wurden bei Bedarf andere Kolben mit der gewünschten Zelldichte angeimpft. Um die Pigmentsynthese zu induzieren, überführte man dunkelgezogene Algen ins Licht. Dazu wurden die Algenzellen steril abzentrifugiert, mit autoklaviertem, glucosefreiem Medium 2 x gewaschen und in ebenfalls glucosefreiem Medium mit Fluoreszenzlicht (600 Lux) bestrahlt. Die maximale Pigmentsynthese war nach 7 Tagen Belichtung erreicht.

1.2.1 Anzucht mit Lävulinsäure

Für die Versuche mit Lävulinsäure wurden die Algen im Dunkeln bis zu einer Zelldichte von $4 - 9 \times 10^7$ Zellen/ml angezogen und wie beschrieben auf glucosefreies Medium umge-

setzt. Dann wurde sofort die entsprechende Menge Lävulin-säure mit Hilfe eines Millipor-Filters steril hinzufil-triert. Die Stammlösung war 1 M und die Endkonzentration richtete sich nach der Zellzahl, ausgehend von 2 mM bei einer Zelldichte von ca. 4×10^7 bis zu 5 mM bei 9×10^7 . Es folgten 3 Tage (72 h) Belichtung, dann wurden die Zellen geerntet.

1.2.2 Anzucht mit ^3H -Leucin

L-3,4,5- ^3H (N)-Leucin (NEN-Chemicals), 250 μCi gelöst in 0.25 ml 0.01 N HCl (spezifische Aktivität 158 Ci/mmol), wurde mit 0.01 N HCl auf 2.5 ml aufgefüllt. 100 bzw. 500 μl ($\hat{=}$ 10 bzw. 50 μCi) dieser Lösung wurden jeweils zu 100 ml Algensuspension pipettiert, außerdem 0.1 bzw. 1 ml einer autoklavierten Stammlösung, die 131 mg kaltes Leucin in 10 ml ($\hat{=}$ 100 mM) 0.1 N HCl enthielt. Die Parallelansätze wurden zusätzlich mit der der Zellzahl entsprechenden Menge Lävulinsäure versetzt.

1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit der Neubauer'schen Blutkörperchen-Zählkammer bestimmt:

$$\frac{\text{Zellzahl einer Kammerhälfte}}{16 \times 25} \times 40 \times 10^5 = \text{Zellen/ml}$$

2. Ernte der Algen

Je nach Ansatzgröße wurden die Algen in 250 ml- oder 1000 ml-Stahlbechern bei 15000 x g 15 min vom Medium abzentrifugiert, 2 x mit 0.1 M Tris/HCl-Puffer pH 7.8 gewaschen und eingefroren. Bei -18°C waren die Algen mindestens 3 Jahre haltbar.

3. Herstellung der Rohextrakte

Die aufgetauten Algenzellen wurden mit der 2 - 5-fachen Menge Glasperlen ($\varnothing$ 0.25 - 0.30 mm) gemischt und durch 2-stündiges hochfrequentes Schütteln in einer Vibrogen-Zellmühle bei gleichzeitiger Wasserkühlung aufgebrochen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden mit 0.1 M Tris/HCl-Puffer pH 7.8 (ca. 5 - 10 ml/g Algen) von den Glasperlen abgespült und durch Zentrifugation (12000 x g, 60 min) in einer Ultrazentrifuge (WKf Hitachi 65 P) Zellreste und Membranen abgetrennt. Der klare Überstand wurde gegen H₂O bidest. dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. In diesem Zustand konnten die Rohextrakte bei -18°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

4. Anti-Phycocyanin-Antiserum

4.1 Immunisierung der Kaninchen

4 ml einer PC-Lösung (elektrophoretisch reines PC aus Cyanidium caldarium; 0.4 mg PC/ ml 0.01 M Natriumphosphatpuffer pH 7.0) wurden mit 6 ml Freundschem Adjuvans (komplett) sorgfältig mittels zweier an den Spitzen zusammengeschaubarer Glasspritzen emulgiert. Jeweils 2.5 ml dieser Lösung pro Tier ($\approx$ 0.4 mg PC/Tier) wurde subcutan an den Flanken und im Genick der Tiere injiziert. Nach 5 Wochen erfolgte eine Booster-Injektion analog der ersten mit 0.2 mg PC/Tier.

4.2 Gewinnung des Serums

Nach weiteren 2 Wochen wurde den Tieren Blut aus der Ohrvene entnommen (20 - 80 ml/Tier). Zur Gerinnung wurde das Blut in Bechergläsern über Nacht bei 37°C gehalten, anschließend das Serum vom Blutkuchen abdekantiert, zentrifugiert und sortiert in kleinen Portionen eingefroren.

So konnte es ohne merklichen Aktivitätsverlust über 2 Jahre aufbewahrt werden. Für sämtliche Versuche wurde das Rohserum ohne weitere Reinigung verwendet.

5. Immunchemische Methoden

5.1 Ouchterlony-Doppeldiffusion

Zur Herstellung der Agarosegele wurden 2 g Agarose (SERVA) mittlerer Elektroendosmose (EO) (gemischt aus Agarose mit hoher EO und Agarose ohne EO) in 200 ml PBS^{a)} bis zur Bildung einer klaren Lösung im Wasserbad erhitzt. Nach Zugabe von 2 ml einer 2 %igen Natriumazidlösung als Konservierungsmittel wurde die Agarose ca. 2 mm hoch in Plastik-Petrischalen oder auf Objektträger gegossen. Nach dem Erstarren wurden mit Hilfe einer Schablone Löcher ausgestanzt, die einen Durchmesser von 2 mm und ein Fassungsvermögen von ca. 10 µl hatten. Sechs Vertiefungen waren ringförmig um eine zentrale angeordnet. In die mittlere Öffnung wurden 10 µl unverdünntes Antiserum pipettiert und in die äußeren jeweils 10 µl der unverdünnten Rohextrakte (Proteinkonzentration 4 - 13 mg/ml). Die Agaroseplatten wurden in einem Exsiccator, der einige Zentimeter hoch Wasser enthielt, aufbewahrt. Nach 2 - 3 Tagen waren die Präzipitationslinien deutlich zu sehen.

5.2 Immunfixierung

(nach Arnaud et al., 1977)

Die Immunfixierung wurde direkt im Anschluß an ultradünnschicht-isoelektrische Fokussierungen (vergl. 6.)

a) PBS = Phosphatgepufferte Saline pH 7.0

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0.2 M/l	33 ml
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.2 M/l	67 ml
NaCl	8.5 g/l	ad 1000 ml H_2O dest.

durchgeführt. Auf die Größe des fokussierten Gels zurechtgeschnittene Celluloseacetat-Streifen ("Cellogel", Chemetron, Milano) wurden mit H_2O dest. gewaschen und gründlich mit Antiserum (1 : 10 mit PBS verdünnt) getränkt, anschließend auf das Gel gelegt und für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur belassen. Für weitere 30 min wurden Gel und Streifen mit einer Glasplatte und einem Gewicht (ca. 1000 g) beschwert. Nach Entfernen des Glases wurden Gel und Streifen getrennt für 16 h in 2 l 0.9 %iger NaCl-Lösung ausgewaschen, wobei die Lösung 2 x gewechselt wurde. Danach wurden Gel und Streifen 10 min in Serva Blau G gefärbt, entfärbt und getrocknet (Färbe- und Entfärbelösung siehe 6.4). Die Celluloseacetatfolien waren sehr schlecht haltbar. Obwohl zwischen Plastikfolien aufbewahrt, verblaßte die blaue Anfärbung und in vielen Fällen wurden die Celluloseacetatfolien durchsichtig, so daß keine Banden mehr zu erkennen waren.

5.3 Zweidimensionale Immunelektrophorese

nach Laurell (1965), modifiziert von Clarke und Freeman (1968)

5.3.1 Herstellung der antikörperhaltigen Agarosegele

Zur Erzielung gleichmäßiger Gele wurde die antikörperhaltige Agarose zwischen zwei Glasplatten (10 x 10 cm) im Abstand von 480 μm gegossen. Der Abstand entspricht genau 4 Lagen Parafilm, die U-förmig zugeschnitten wurden. Die Glasplatten mit dem Abstandhalter dazwischen wurden mit mehreren Klammern zusammengehalten.

Agarosegel: 0.8 g Agarose mittlerer EO in
100 ml Veronalpuffer 15 mM

Veronalpuffer pH 8.2:

2.76 g 5,5-Diethylbarbitursäure
3.09 g 5,5-Diethylbarbitursäure-Na-Salz
200 mg Na-azid

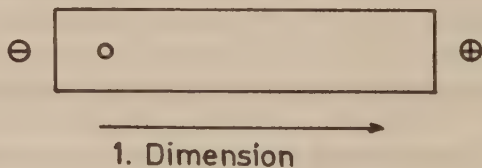
ad 1000 ml H_2O dest.

Die Agarose wurde im kochenden Wasserbad gelöst und auf 45°C abgekühlt. 5.5 ml Agarose wurden rasch mit 50 µl (in einigen Fällen auch 100 µl) unverdünntem Antiserum gemischt und luftblasenfrei zwischen die senkrecht stehenden Glasplatten eingefüllt. Nach dem Verfestigen der Agarose wurde die obere Glasplatte vorsichtig mit einer Rasierklinge gelockert und entfernt.

5.3.2 1. Dimension

5.3.2.1 Elektrophorese

Die antigenhaltige Probe (PC, F2) wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden Agarosegele ohne Antiserum auf die Größe eines Objektträgers zurechtgeschnitten und im Abstand von ca. 1 cm von einer Schmalseite ein Loch gestanzt und 10 µl der Probe zusammen mit einem Tropfen 0.05 %iger Bromphenolblau-Lösung eingefüllt (Proteinkonzentration: PC ~ 1 mg/ml, F2 ~ 3 mg/ml).



Elektrodenpuffer: Veronalpuffer pH 8.6

4.12 g 5,5-Diethylbarbitursäure-Na-salz

0.80 g 5,5-Diethylbarbitursäure

ad 1000 ml H₂O dest.

Die Elektrophorese wurde auf einem Multiphor-Gerät (LKB) unter Wasserkühlung (10 - 15°C) durchgeführt, die Stromstärke betrug 2 mA/Gel. Wenn das Bromphenolblau den Objektträger erreicht hatte, war die Elektrophorese beendet.

5.3.2.2 Isoelektrische Fokussierung

Dazu wurden 480 µm dicke Acrylamidgele zwischen zwei Glasplatten gegossen.

Acrylamidlösung: 30.0 g Acrylamid (SERVA, 2 x kristallisiert)
 0.8 g Methylen-Bisacrylamid (SERVA)
 in 100 ml H₂O bidest.

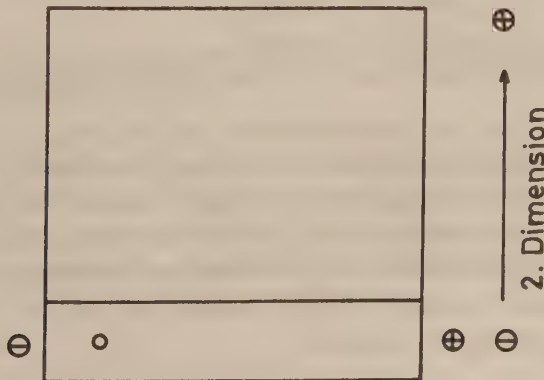
Katalysator: 150 mg Ammoniumperoxodisulfat (Merck)
 in 10 ml H₂O bidest.

Gelzusammensetzung: 1.5 ml Acrylamidlösung
 0.15 ml Servalyt pH 4 - 9
 4.1 ml H₂O bidest.
 0.3 ml Katalysator

Die ersten 3 Komponenten wurden in einer 100 ml-Saugflasche im Eisbad gemischt und entgast, erst dann wurde der Katalysator zugegeben. Die Durchführung erfolgte wie unter 6.3.

5.3.3 2. Dimension

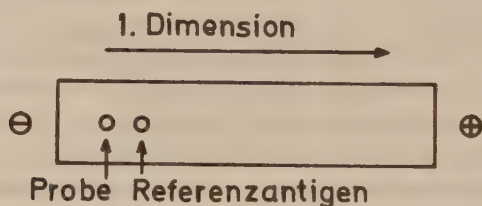
Nach dem ersten Lauf wurden die Gele umgehend nach folgender Skizze an das antikörperhaltige Agarosegel gelegt. Dabei wurde besonders auf den vollständigen Kontakt der beiden Gele geachtet. Wenn nötig, wurden die Gele mit einer Rasierklinge begradigt.



Die Elektrophorese wurde unter den gleichen Bedingungen wie in der 1. Dimension durchgeführt, die Stromstärke betrug jedoch 4 mA/Gel. Eine Laufzeit von 15 - 18 h war erforderlich.

5.3.4 Tandem-Technik

Im Unterschied zur vorher beschriebenen Technik wurden für die 1. Dimension zwei Löcher im Abstand von 0.5 cm gestanzt und auf diese Weise Probe und Referenzantigen gleichzeitig aufgetrennt.



5.3.5 Färben und Trocknen der Gele

Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die nicht präzipitierten Proteine zwei Tage in NaCl-haltigem Tris-Puffer (I) bei 4°C ausgewaschen, das Gel danach noch 1 h in Puffer ohne NaCl gewässert.

I	II	12.1 g Tris	($\hat{=}$ 50 mM)
		0.4 g NaN_3	($\hat{=}$ 3 mM)
		18.0 g NaCl	($\hat{=}$ 0.9 %)

ad 2000 ml H_2O dest., mit HCl auf pH 8.4 einstellen.

Danach wurde das Gel luftblasenfrei mit feuchtem Filterpapier bedeckt und im warmen Luftstrom getrocknet. Es folgte 15-minütige Fixierung in 12.5 %iger Trichloressigsäure, 2 x Waschen mit Entfärbelösung und 30 min Färben in Coomassie Blau. Nach dem Entfärben und Trocknen bei Raumtemperatur waren die Gele unlösbar auf der Glasplatte fixiert und konnten so aufbewahrt werden.

Entfärbelösung: 450 ml Methanol
90 ml Eisessig
ad 1000 ml H_2O dest.

Färbelösung: 0.2 g Serva Blau G
in 100 ml Entfärbelösung

Gebrauchter Entfärber wurde über Aktivkohle regeneriert.

5.4 Immunpräzipitation in vitro

Zur Gewinnung zentrifugierbarer Immunpräzipitate für SDS-Elektrophoresen bzw. zur Bestimmung des Chromophor-Protein-Verhältnisses in diesen Präzipitaten wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen die entsprechenden Antigene (Rohextrakt, PC, F2) und Antiserum gemischt und bei 4°C 24 h aufbewahrt. Die Niederschläge wurden in einer Tischzentrifuge (Hettich Mikroliter) bei 12000 UpM abzentrifugiert und 2 x mit PBS gewaschen.

Die Antigenmengen betragen zwischen 100 µl und 1 ml, das Volumenverhältnis Antigen : Antikörper (unverdünntes Rohserum) betrug zwischen 1 : 1 und 1 : 2 für PC (Proteinkonzentration 1.6 mg/ml), zwischen 3 : 1 und 1 : 1 für die verschiedenen Rohextrakte und zwischen 2 : 1 und 1 : 1 für F2 je nach dem Proteingehalt der Antigenprobe. In einigen Fällen mußte nochmals mit Antigen nachgefällt werden.

5.5 Bestimmung des Chromophor-Protein-Verhältnisses in Immunpräzipitaten

Abzentrifugierte und 3 x mit PBS gewaschene Immunpräzipitate wurden mit je 0.5 ml Essigsäure versetzt. Zum besseren Lösen wurden die Proben 30 - 60 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Extinktionen bei 620 und 280 nm gemessen.

Elektrodenlösungen

Anolyt: 333 mg DL-Asparaginsäure
368 mg L-Glutaminsäure
in 100 ml H₂O bidest. unter leichtem Erwärmen
lösen

Katholyt: 12 ml Ethylendiamin
auf 100 ml mit H₂O bidest. auffüllen
435 mg DL-Arginin (freie Base)
365 mg L-Lysin (freie Base) darin lösen

Die Elektrodenlösungen können ca. 2 Monate bei +4°C aufbewahrt werden.

6.3 Durchführung der isoelektrischen Fokussierung

Von den großen Gelen wurden jeweils Stücke in der gewünschten Breite abgeschnitten (Länge 12 cm $\hat{=}$ Trennstrecke), die Deckfolie abgezogen und das Gel mit der Trägerfolie auf die gekühlte Platte einer Flachbett-Elektrophorese-Apparatur gebracht. Einige Tropfen Wasser oder Kerosin unter der Folie verbesserten den Kühleffekt. 5 mm breite, 2 mm dicke Filterkartonstreifen (MN 866 Machery & Nagel, Düren) wurden mit Anolyt bzw. Katholyt getränkt und an beiden Seiten des Gels aufgelegt. Über zwei dünne Platinelektroden, die auf die Filterstreifen gedrückt wurden, erfolgte der Stromfluß. Zum Auftragen der Proben wurde ein Applikationsband aus Silicongummi mit schlitzförmigen Öffnungen (SERVA) verwendet, das ca. 1 cm von der Anode entfernt auf das Gel gelegt wurde. Das Auftragvolumen betrug 5 - 20 µl pro Bahn mit einer Proteinkonzentration zwischen 4 und 13 mg/ml. Die Präfokussierung erfolgte (ohne Proben) 30 min bei 400 V, nach dem Probenauftrag wurde jeweils 30 min bei 400 V, 800 V und 1200 V fokussiert.

6.4 Färben und Aufbewahren der Gele

Nach Beendigung der Fokussierung wurden die Proteine 10 min in 20 %iger Trichloressigsäure fixiert, mit Entfärber gewaschen und 10 min mit Coomassie Blau gefärbt. Nach dem Entfärben wurde das Gel an der Luft getrocknet und konnte so, fest mit der Trägerfolie verbunden, unbegrenzte Zeit aufbewahrt werden.

Entfärbelösung: 250 ml Methanol
100 ml Eisessig
650 ml H₂O

Färbelösung: 1 g Serva Blau G
in 100 ml Entfärber

Diese Stammlösung wurde vor Gebrauch 1 : 10 verdünnt.

7. Präparative Isoelektrische Fokussierung

Sephadex G-200 wurde mit H₂O bidest. aufgeschlämmt, bis ein dickflüssiges Gel entstand, pro 100 ml mit 2.6 ml Servalyt pH 4 - 9 vermischt und auf eine Fokussierplatte (LKB) gegossen. Mit einer IR-Lampe wurde das Gel bis kurz vor den Crack-Punkt (ca. 25 % Gewichtsabnahme) getrocknet. An beiden Schmalseiten wurden die 1.5 cm breiten Filterstreifen, die zuerst mit H₂O bidest. + 2.6 % Servalyt getränkt worden waren, durch Filterstreifen mit Anolyt bzw. Katholyt (vergl. 6.2) ersetzt.

Es wurden die F2-Fractionen von 3 Aufarbeitungen vereinigt und gegen 1 %ige Glycin-Lösung dialysiert. 3.5 ml dieser Lösung wurden mit 100 µl Servalyt versetzt und mit Hilfe der Auftragschablone in das Sephadex-Gel gemischt.

Die Fokussierung wurde mit 200 V und 2.8 W begonnen (LKB 3371 E, Power Supply), innerhalb der nächsten 4 h auf 600 V und 5.1 W gesteigert. Nach weiteren 16 h war die Leistung

bei 600 V auf 2.5 W abgesunken, die Fokussierung wurde beendet. Mit einem Fraktioniergitter wurden 30 Fraktionen markiert, die Gelanteile herausgeholt, mit je 3 ml H₂O bidest. eluiert und die Extinktionen bei 280 und 620 nm gemessen sowie der pH-Wert jeder Fraktion bestimmt.

8. Proteinbestimmung

nach Heil und Zillig (1970)

Von den zu bestimmenden Lösungen wurden je 2 µl auf einen Celluloseacetat-Streifen (Schleicher und Schüll, Elektrophorese-Folien) getüpfelt und getrocknet (am besten mehrere auf einmal). Der Streifen wurde mit Amidoschwarz 10 min gefärbt, entfärbt und zwischen Zellstoff getrocknet. Die blau gefärbten Flecke wurden mit Hilfe einer Metallstanze (ø 7 mm) ausgestanzt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in 0.5 ml Säuremischung aufgelöst.

Säuremischung:

Eisessig	80 %
Ameisensäure	10 %
TCA	1 %
H ₂ O dest.	9 %

Amidoschwarzlösung:

Amidoschwarz	0.24 g	in
Methanol	45	ml
Eisessig	10	ml
H ₂ O dest.	45	ml

Die Extinktion dieser Lösungen wurde bei 630 nm gemessen (Perkin Elmer 320 Spektrophotometer) und mit Hilfe einer Eichkurve (Abb. 36) aus BSA-Standards, die in gleicher Weise behandelt worden waren, die Proteinmenge bestimmt. Die Referenzküvette enthielt ein gleichermaßen behandeltes Stück Celluloseacetat-Folie ohne Protein. Zur Kontrolle wurden außerdem bei jeder Bestimmung 2 bis 3 Standards aufgetragen und mit der Eichkurve verglichen. Wenn nötig, wurden die Werte entsprechend korrigiert.

Für die Bestimmung SDS-gelöster Proteine (vorwiegend Immunpräzipitate in SDS-Probenpuffer) mußte eine eigene

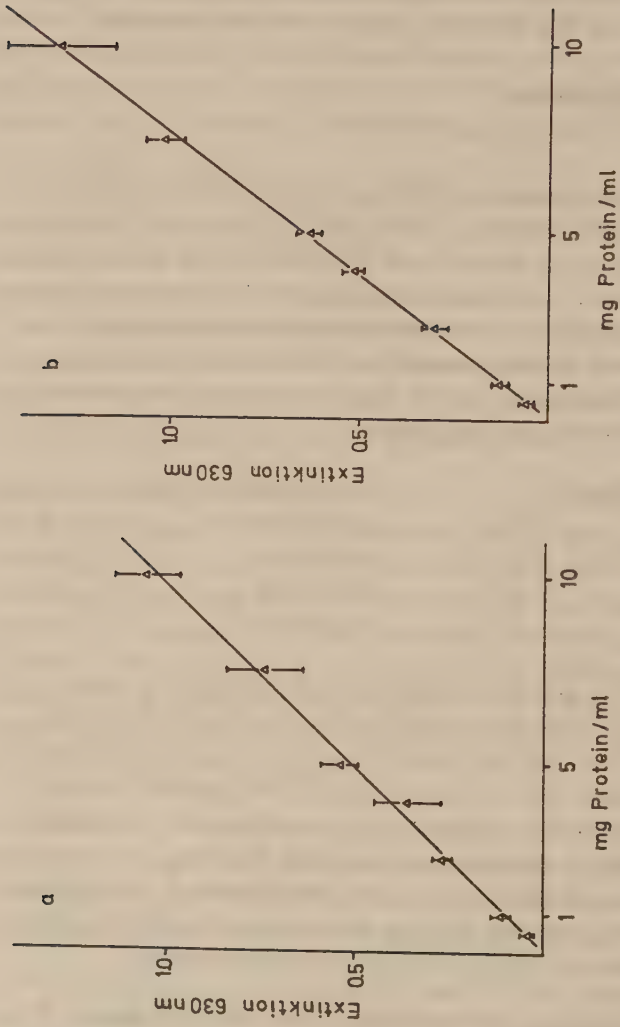


Abb. 36: Eichkurven für die Proteinbestimmung (Heil und Zillig, 1970)

a) Lösungsmittel für die Proben H_2O oder PBS

b) Lösungsmittel für die Proben SDS-haltiger Probenpuffer (vergl. 9.2)

Eichkurve erstellt werden, für die das BSA in eben dieser SDS-Lösung gelöst wurde. Durch die Bindung des SDS an das Protein ändert sich die Amidoschwarzbindung, laut Literatur (Neuhoff, 1981) wird sie erniedrigt, hier wurde dagegen eine leicht erhöhte Bindung und somit etwas höhere Extinktionswerte gefunden (Abb. 36b).

9. SDS-Elektrophorese im Polyacrylamid-Gradientengel nach Laemmli (1970); Mirault und Scherrer (1971)

Die SDS-Elektrophoresen wurden in einer Vertikal-Elektrophorese-Apparatur der Firma Hölzel durchgeführt. Der Acrylamid-Gradient betrug 5 - 25 % bei einem Gelkammervolumen von ca. 20 ml, die Dicke des Gels betrug 1.5 mm. In allen Fällen wurden Gele verwendet, die sich aus Trenngel und Sammelgel zusammensetzten.

9.1 Gießen der Gradienten-Gele

9.1.1 Trenngel-Lösungen

	5 %	25 %
H ₂ O bidest.	8.35 ml	3.75 ml
Tris/HCl 1 M pH 8.8	7.5 ml	7.5 ml
Acrylamidlösung	3.35 ml (30%)	8.4 ml (60%)
SDS (10 %)	0.2 ml	0.2 ml
TEMED (5 %)	0.2 ml	0.05 ml
Katalysator	0.4 ml	0.1 ml
Acrylamidlösungen	30 %	60 %
Acrylamid (SERVA, 2 x kristallisiert)	30.0 g	60.0 g
Methylenbisacrylamid	0.8 g	1.6 g
jeweils ad 100 ml H ₂ O bidest.		

Die 60 %ige Acrylamidlösung mußte vor jedem Gebrauch unter Erwärmen gelöst werden.

Beide Acrylamidlösungen und die Tris-Puffer wurden durch Membranfilter filtriert.

Katalysator

Ammoniumperoxodisulfat 150 mg in 10 ml H₂O bidest.

9.1.2 Sammelgel-Lösung 3 %ig

H ₂ O bidest.	14.7 ml
Tris/HCl 1 M pH 6.8	2.5 ml
Acrylamidlösung (30 %)	2.0 ml
SDS (10 %)	0.5 ml
TEMED (5 %)	0.2 ml
Katalysator	0.4 ml

Die 5 %ige und die 25 %ige Trenngellösung wurden in 100 ml-Saugflaschen gemischt und vor Zugabe des Katalysators 2 - 3 min entgast. In einem einkammerigen Mischgefäß mit variablem Volumen (Abb. 37) wurden 12 ml der 5 %igen Gellösung vorgelegt. Über einen Polyethylenschlauch wurde die konzentrierte Lösung kontinuierlich zugeführt und mit der vorgelegten vermischt. Der Ausgang am Boden des Mischgefäßes wurde mit einem Polyethylenschlauch über eine Peristaltikpumpe mit dem Einfüllstutzen an der Unterseite der Gelkammer verbunden. In der Gelkammer befand sich ca. 2.5 cm hoch H₂O dest., das mit der einlaufenden Gellösung hochstieg und während der Polymerisation Luftabschluß und eine ebene Oberfläche für das Sammelgel garantierte. Die Pumpgeschwindigkeit betrug etwa 40 ml/h. Das Gel polymerisierte innerhalb etwa 1 h, dann wurde das Wasser mit einer Spritze abgesaugt und mit Zellstoff möglichst vollständig entfernt. Die entgaste Sammelgellösung wurde bis zum oberen Rand der Gelkammer eingefüllt und der Kamm luftblasenfrei zwischen die Glasplatten eingeschoben. Nach ca. 2 h war die Polymerisation beendet.

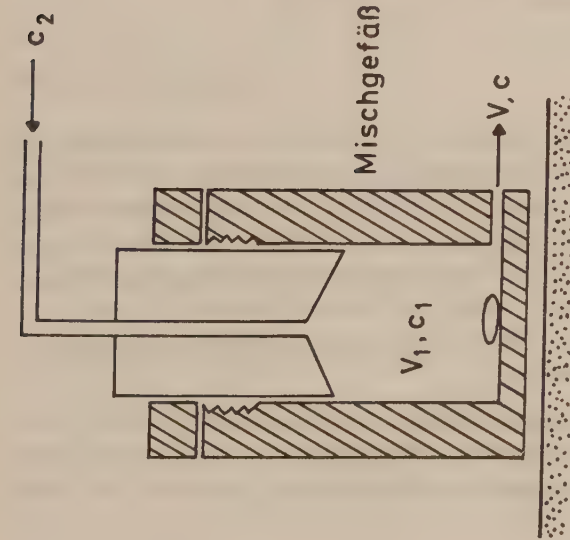


Abb. 37: Skizze des verwendeten ein-kammerigen Mischgefäßes für den exponentiellen Acrylamid-Gradienten (vergl. Formel S. 28)

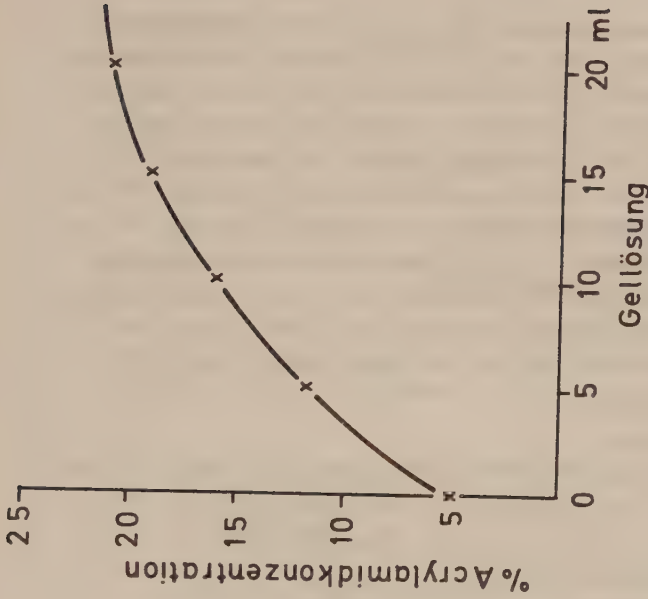


Abb. 38 : Exponentieller Acrylamid-Gradient für ein Gelkammervolumen von 20 ml. Höhe 11.7 cm, Breite 11.4 cm, Dicke 1.5 mm

9.2 Vorbereiten der Proben

In der überwiegenden Zahl der Fälle wurden Immunpräzipitate aufgetrennt. Die nach 5.4 behandelten Niederschläge wurden in einem definierten Volumen Probenpuffer gelöst. Gefriergetrocknete Substanzen ebenfalls, zu Proteinlösungen wurden einige Körnchen festes SDS gegeben. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration in diesen Proben wurde das Volumen, das einem Proteingehalt von ca. 30 µg entsprach, entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit Probenpuffer auf 20 µl aufgefüllt. Zur vollständigen Dissoziation der Proteine wurden die Proben 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt und zum Sammeln der Proben kurz zentrifugiert.

Probenpuffer

H ₂ O dest.	4.85 ml
Tris/HCl 1 M pH 6.8	0.65 ml
SDS (10 %)	2.0 ml
2-Mercaptoethanol	0.5 ml
Glycerin	1.0 ml
Bromphenolblau (0.1 %)	1.0 ml

9.3 Probenauftrag

Dazu wurde die Gelkassette in die endgültige Position gebracht und die Elektrodenkammern mit Laufpuffer gefüllt. Mit einer Automatic-Pipette, an deren Pipettenspitze sich ein sehr feiner Polyethylenschlauch befand, wurden die Proben (20-25 µl) in die Gelaussparungen unter den Laufpuffer unterschichtet. Leere Geltaschen wurden mit Probenpuffer aufgefüllt, ebenso die beiden äußeren Aussparungen links und rechts.

Kammerpuffer = Laufpuffer pH 8.3

Tris	3.0 g/l	($\hat{=}$ 0.025 M)
Glycin	14.4 g/l	($\hat{=}$ 0.192 M)
SDS	1.0 g/l	($\hat{=}$ 1 %)

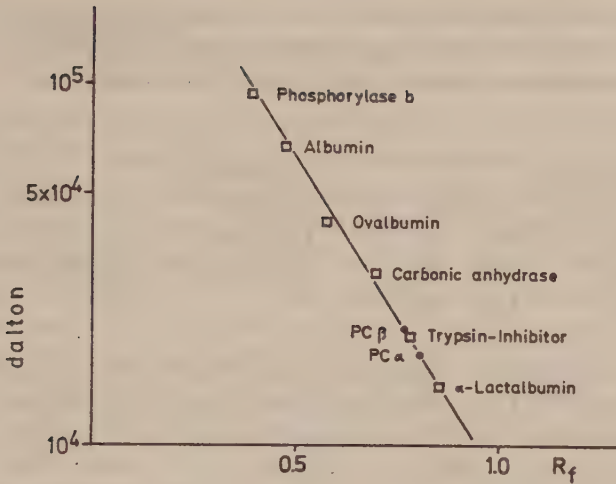


Abb. 39: Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der SDS-Elektrophorese im Gradientengel 5 - 25 % Acrylamid. Eichproteine: LMW calibration kit (Pharmacia). Die für die α - und β -Untereinheiten des PC gefundenen Werte (α 18.0 kD, β 20.1 kD) weichen etwas von den Literaturdaten ab (α 18.3 kD, β 19.6 kD).

9.4 Elektrophorese

Der Lauf wurde bei 4°C in einer Kühlkammer durchgeführt. Es wurde eine konstante Spannung von 110 - 120 V angelegt (Kathode oben, Anode unten), wobei die Laufzeit ca. 17 - 18 h betrug. Nach dieser Zeit war die Bromphenolblaufront am unteren Ende des Gels angelangt.

9.5 Färben und Fixieren der Gele

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel aus der Apparatur herausgenommen und 1 h bei 50°C unter Schütteln gefärbt und gleichzeitig fixiert. Die ebenfalls in der Wärme

entfärbten Gele (beschleunigte den Vorgang) wurden in Entfärber aufbewahrt und zur Dokumentation fotografiert. Die Vakuumtrocknung eignete sich nicht für Gradientengele.

Färbelösung:			Entfärber:	
Serva Blau G	2.5 g	in	Methanol	250 ml
Propanol-2	455	ml	Eisessig	375 ml
Eisessig	90	ml	H ₂ O dest.	ad 5000 ml
H ₂ O dest.	455	ml		

Methanol wurde später durch Propanol-2 ersetzt, da beim Regenerieren des Entfärbers über Aktivkohle zu viel Methanol verdunstete und sich so im Lauf der Zeit die Zusammensetzung des Entfärbers änderte.

10. Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung nach Auftrennung von Immunpräzipitaten im SDS-Gradientengel

10.1 Elution im Szintillations-Cocktail

Nach dem Färben und Entfärben des Gels wurden die entsprechenden Bahnen mit einer Rasierklinge längs herausgeschnitten, quer in 8 möglichst gleich große Stücke geteilt und auf Szintillationsgläschen verteilt. Die Gelstücke wurden bei 60°C getrocknet, anschließend mit je 100 µl H₂O über Nacht wieder gequollen und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumasolve - Lipoluma 1 : 10, LKB) bis zur cpm-Konstanz gezählt. Als Nullwert diente ein farbloses Gelstück und als Quenchkontrolle ein mit Coomassie angefärbtes Gelstück (ohne Markierung), dem vor dem Trocknen eine bekannte cpm-Menge zupipettiert worden war.

10.2 Fluorographie

nach Bonner und Laskey (1974)

Das gefärbte und entfärbte Gel wurde 2 x 30 min in DMSO (Dimethylsulfoxid) entwässert, anschließend 3 - 4 h in einer 22 %igen Lösung von PPO (2,5-Diphenyloxazol) in DMSO unter Schütteln inkubiert und 2 x 15 min mit H_2O gewaschen. Danach wurde das Gel auf eine Platte aus Silicongummi gebracht, mit einem zurechtgeschnittenen Filterpapier und einer quadratischen Glasfritte bedeckt. Eine zweite Silicongummiplatte wurde darüber gelegt, mit einem Anschluß für die Wasserstrahlpumpe. Siliconöl zwischen beiden Platten sorgte für luftdichten Abschluß. Über Wasserdampf wurde das Gel im Vakuum getrocknet. In der Dunkelkammer wurde ein besonders empfindlicher Film (Ultrofilm 3H , LKB) mit der beschichteten Seite auf das trockene Gel gelegt, zwischen zwei Glasplatten fixiert und 8 Wochen im Dunkeln aufbewahrt. Die Entwicklung erfolgte mit Kodak D 19, die Fixierung mit handelsüblichen Lösungen.

11. Versuch mit ^{14}C -Häminchlorid als Chromophorvorstufe

In einem Parallelansatz wurden Algen mit und ohne LA 72 h belichtet. Nach Zentrifugation und zweimaligem Waschen mit H_2O erhielt man je Ansatz ca. 20 ml gepackte Zellen ($\hat{=}$ 3 l Algensuspension mit 7×10^7 Zellen/ml). Die im Folgenden beschriebene Behandlung und Aufarbeitung wurde parallel für beide Ansätze durchgeführt.

15 ml gepackte Zellen wurden in 150 ml glucosefreiem Medium pH 8.0 resuspendiert (restliche 5 ml für Biliverdinversuch). In Abänderung des Mediums pH 2.3 (vergl. 1.1) wurde H_2SO_4 weggelassen, die KH_2PO_4 -Konzentration auf 0.34 g/l erhöht und außerdem $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ bis zu einer Konzentration von 17.01 g/l zugegeben (Brown et

al., 1981). 9.8 mg ^{14}C -Häminchlorid (15 μmol) bzw. 9.53 mg (14.6 μmol) für den Ansatz ohne LA wurden in 2 ml 0.5 N NaOH gelöst und zur Algensuspension gegeben. Nach 3 1/4-stündiger Inkubation im Dunkeln bei 27°C wurden die Zellen abzentrifugiert und in 300 ml glucosese freiem Medium pH 2.3 ins Licht gebracht. Nach 30 min, 3.5 h und 16.5 h wurden jeweils Aliquote von 100 ml entnommen, abzentrifugiert und die Zellen in der Vibrogen-Zellmühle aufgebrochen. Zu den ultrazentrifugierten Rohextrakten wurde soviel PC-haltiger Rohextrakt einer früheren Aufarbeitung gegeben, bis die Extinktion bei 620 nm ca. 0.5 betrug. In diesen Rohextrakten wurden pro 10 ml 0.1 g Aktivkohle aufgeschlämmt und 1.5 h lichtgeschützt im Eisbad belassen. Nach Zentrifugation (20 min bei 44000 x g) wurden die Rohextrakte erst einer 20 %igen, anschließend einer 60 %igen Ammonsulfatfällung unterzogen. Das Pellet wurde in 3 ml H_2O bidest. gelöst und über Nacht gegen H_2O bidest. dialysiert. Von den dialysierten Lösungen, deren Volumen z.T. auf über das Doppelte zugenommen hatte, wurden je 2 ml mit 4 ml Antiserum vermischt und über Nacht bei 4°C belassen. Die gebildeten Immunpräzipitate wurden gewaschen und mit 1 ml SDS-Probenpuffer (vergl. 9.2) versetzt. Da auch nach längerem Kochen im Wasserbad ein Teil ungelöst blieb, wurden die Proben mit einem Potter homogenisiert und davon 100 μl für die Szintillationszählung eingesetzt.

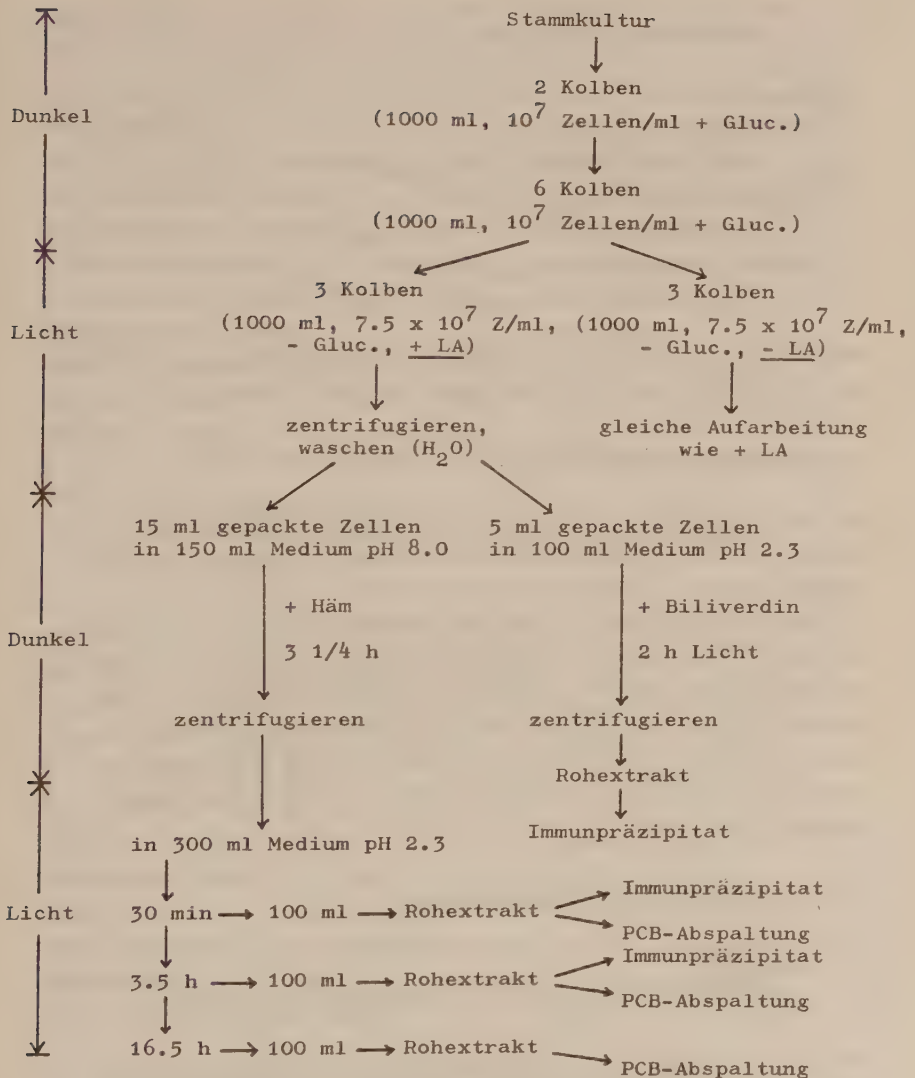
11.1 Bestimmung des Chromophorgehaltes

Die Berechnung der Chromophormenge in mmol mit Hilfe der Extinktion erfolgte nach der Formel:

$$\frac{E \times V}{\epsilon \times d} = \text{mmol Chromophor}$$

E = Extinktion (einschließlich Verdünnungsfaktor)

V = Volumen der Probe



Schema 1: Übersicht über die Anzucht und Behandlung der *C. caldarium*-Zellen zum Versuch über den Einbau radioaktiv markierter Chromophor-Vorstufen (^{14}C -Häm und ^{14}C -Biliverdin).

ϵ = Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke = 1 cm

Dabei gilt für:

PCB (nativ), $\lambda_{\max}$ 620 nm	$\epsilon = 99000$
(Kufer und Scheer, 1979: $\lambda_{\max}$ 620 nm)	
PCBdme (Kation), $\lambda_{\max}$ 650 nm	$\epsilon = 37900$
(Brandlmeier et al., 1981: $\lambda_{\max}$ 690 nm)	
PCBdme (freie Base), $\lambda_{\max}$ 610 nm	$\epsilon = 12300$
(Brandlmeier et al., 1981: $\lambda_{\max}$ 600 nm)	

Bei der Berechnung des PC-Gehalts in mg geht ϵ_{nativ} dreimal ein (3 Chromophore), außerdem das MG 37900.

12. Versuch mit Biliverdin als Chromophorvorstufe

Je 5 ml gepackte Zellen wurden in 100 ml glucosefreiem Medium pH 2.3 resuspendiert. Dazu kamen je 200 μ l der folgenden Lösung: ^{14}C -Biliverdindimethylester wurde in 1.8 ml Methanol gelöst, die cpm bestimmt, der Alkohol mit N_2 wieder abgeblasen; in 300 μ l 2 N H_2SO_4 wurde der Ester im kochenden Wasserbad verseift, anschließend mit 2 Tropfen Aceton und 100 μ l H_2O dest. auf 400 μ l aufgefüllt. Nach 2-stündiger Inkubation im Licht wurden die Algen abzentrifugiert und aufgebrochen. Die weitere Behandlung erfolgte wie unter 11.

13. Abspaltung des PCB-Chromophors

13.1 mit HBr

nach Brandlmeier (1981); Schram und Kroes (1971)

Die nach Dialyse erhaltenen Rohextrakte (vergl. 11.), abzüglich der 2 ml für die Immunpräzipitate, wurden gefriergetrocknet, in je 3 - 4 ml wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst und 10 min mit N_2 gespült. Dann wurde ca.

20 min HBr durchgeleitet und anschließend mit N_2 zur Trockne eingeengt. Die Rückstände wurden in 4 ml Methanol/meth. H_2SO_4 (5 %ig) 1 : 1 aufgenommen und zur Veresterung über Nacht bei $-20^\circ C$ aufbewahrt. Von einem farblosen Niederschlag wurde abzentrifugiert, anschließend die Dimethylester in Dichlormethan überführt (3 x 1 ml) und von Säure- und Methanolresten mit Wasser (6 x 3 ml) befreit. Die Lösung wurde quantitativ auf eine Dünnschichtplatte (HPTLC Kieselgel-G-Platten, Merck) aufgetragen und mit CCl_4 /Essigsäuremethylester (1 : 1, v : v) aufgetrennt. Die blaue Hauptbande des PCBdme wurde ausgekratzt, mit Methanol eluiert, spektroskopisch die Menge bestimmt (vergl. 11.1) und zur Szintillationszählung eingesetzt.

13.2 mit kochendem Methanol

nach O'Carra und O'hEocha (1966); modifiziert von Köst (1974)

900 mg lyophilisiertes PC aus *C. caldarium* wurde 10 min mit 200 ml Methanol gekocht und abfiltriert. Das grüne Filtrat (Chlorophyll etc.) wurde verworfen. Der PC-Rückstand auf dem Filter wurde erneut mit 200 ml Methanol 2 h im Rückfluß gekocht und filtriert. Das Filtrat wurde mit angesäuertem Dichlormethan (2 ml konz. HCl/ 50 ml CH_2Cl_2) versetzt und mit viel Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase, die die freie Säure des PCB-Chromophors enthielt, wurde mehrmals mit Wasser säurefrei gewaschen und mit N_2 zur Trockne eingeengt. Durch wiederholtes Kochen des jeweiligen Filtrerrückstandes konnte die Ausbeute erhöht werden.

14. Bestimmung der spezifischen Aktivität von ^{14}C -Häminchlorid

0.555 mg ^{14}C -Häminchlorid wurden in einem Meßkolben in 5 ml 0.5 N NaOH gelöst. 100 μ l dieser Lösung wurden für

die Szintillationszählung eingesetzt. Parallel dazu wurden 0.550 mg kaltes Häminchlorid in 5 ml 0.5 N NaOH gelöst. Zu 100 µl dieser Lösung wurde eine definierte Menge cpm gegeben, um die Quenchrates der braunen Häm-Lösung zu bestimmen. Die Zählzelle des Beckman-Flüssigkeits-Szintillationszählers LS 100 C wurde zu 91 % bestimmt und dementsprechend die cpm-Werte in dpm umgerechnet.

E. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- Allen, M.B.(1959). Studies with *Cyanidium caldarium*, an anomalously pigmented chlorophyte. Arch. Microbiol. 32, 270.
- Arnaud, P., G.B.Wilson, J.Koistinen und H.M.Fudenberg (1977). Immunofixation after electrofocusing: improved method for specific detection of serum proteins with determination of isoelectric points. J. Immunol. Meth. 16, 221.
- Baylon, M.H.(1981). About the use of blue natural phyco-cyanobiliprotein colorant. B ACA N Med. 165, 1145.
- Beale, S.J.(1971). Studies on the biosynthesis and metabolism of δ -aminolevulinic acid in *Chlorella*. Plant Physiol. 48, 316.
- Beale, S.J. und P.A.Castelfranco (1974). The biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in higher plants. Plant Physiol. 53, 297.
- Beale, S.J., S.P.Gough und S.Granick (1975). Biosynthesis of δ -aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2719.

- Bennett, A. und L.Bogorad (1971). Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins. *Biochemistry* 10, 3625.
- Berns, D.S.(1967). Immunochemistry of biliproteins. *Plant Physiol.* 42, 1569.
- Berns, D.S. (1971). Subunits in biological systems. In: *Biological Macromolecules*, Vol. 5 A, S.N.Timasheff und G.Fasman (eds.), New York, Marcel Decker, pp. 105.
- Bonner, W.M. und R.A.Laskey (1974). A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83.
- Bogorad, L.(1975). Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26, 369.
- Bogorad, L., F.V.Mercer und R.Mullins (1963). In: *Photosynthetic mechanisms of green plants*, B.Kok und A.T.Jagendorf (eds.), National Academy of Sciences, National Research Council, Washington DC, pp. 560.
- Brandlmeier, T.(1981). Die Phytochrom-Chromophore: Biochemische Eigenschaften und Wechselwirkungen mit dem Apoprotein. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Brandlmeier, T., H.Scheer und W.Rüdiger (1981). Chromophore content and molar absorptivity of phytochrome in the P_r form. *Z. Naturforsch.* 36c, 431.
- Braune, W.(1979). C-Phycocyanin - the main photoreceptor in the light dependent germination process of *Anabaena akinetes*. *Arch. Microbiol.* 122, 289.
- Briggs, W.R. und H.V.Rice (1972). Phytochrome: chemical and physical properties and mechanism of action. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23, 293.

- Brown, S.B., A.J.Holroyd und R.F.Troxler (1980). Mechanism of bile-pigment synthesis in algae. ^{18}O -incorporation into phycocyanobilin in the unicellular rhodophyte *Cyanidium caldarium*. Biochem. J. 190, 445.
- Brown, S.B., A.J.Holroyd, R.F.Troxler und G.D.Offner (1981). Bile pigment synthesis in plants. Incorporation of haem into phycocyanobilin and phycobiliproteins in *Cyanidium caldarium*. Biochem. J. 194, 137.
- Bryant, D.A., A.N.Glazer und F.A.Eislerling (1976). Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp. Arch. Microbiol. 110, 61.
- Bryant, D.A., C.S.Hixson und A.N.Glazer (1978). Structural studies on phycobiliproteins. III. J. Biol. Chem. 253, 220.
- Bryant, D.A. und G.Cohen-Bazire (1981). Effects of chromatic illumination on cyanobacterial phycobilisomes. Eur. J. Biochem. 119, 415.
- Burnham, B.F. und J.Lascelles (1963). Control of porphyrin biosynthesis through a negative-feed-back mechanism. Studies with preparations of δ -amino-levulinate synthetase and δ -ALA dehydratase from *Rhodospseudomonas spheroides*. Biochem. J. 87, 462.
- Chua, N.-H. und G.W.Schmidt (1979). Transport of proteins into mitochondria and chloroplasts. J. Cell Biol. 81, 461.
- Clarke, M.H.G. und T.Freeman (1968). Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. Clin. Sci. 35, 403.
- Clausen, J.(1971). In: Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules. T.S.Work und E.Work (general eds.), North-Holland Publishing Company, Amsterdam - London.

- Dobberstein, B., G.Blobel und N.-H.Chua (1977). In vitro synthesis and processing of a putative precursor for the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1082.
- Ellis, R.J.(1981). Chloroplast proteins: synthesis, transport and assembly. Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 111.
- Fellenberg, R. von (1978). Kompendium der allgemeinen Immunologie. 1. Aufl. Berlin - Hamburg, Parey (Parey's Studentexte Nr. 20).
- Fisher, R.G., N.E.Woods, H.E.Fuchs und R.M.Sweet (1980). Three dimensional structures of C-phyococyanin and B-phycoerythrin at 5 Å-resolution. J. Biol. Chem. 255, 5082.
- Fisher, W.R., H.Taniuchi und C.B.Anfinson (1973). On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome c. J. Biol. Chem. 248, 3188.
- Frank, G., W.Sidler, H.Widmer und H.Zuber (1978). The complete amino acid sequence of both subunits of C-phyococyanin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 259, 1491.
- Frederick, J.F. (1976). *Cyanidium caldarium* as a bridge alga between Cyanophyceae and Rhodophyceae: Evidence from immunodiffusion studies. Plant Cell Physiol. 17, 317.
- Freidenreich, P., G.S.Apell und A.N.Glazer (1978). Structural studies on phycobiliproteins. II. Amino acid sequence of the β -subunit. Specific cleavage of the α -subunit. J. Biol. Chem. 253, 212.

- Gantt, E. (1977). Recent contributions in phycobili-
proteins and phycobilisomes. Photochem. Photo-
biol. 26, 685.
- Gantt, E. (1979). Phycobiliproteins of Cryptophyceae. In:
Biochemistry and Physiology of Protozoa, 2nd ed.
Vol. 1, Academic Press, p. 121 - 137.
- Gantt, E. (1981). Phycobilisomes. Ann. Rev. Plant Physiol.
32, 327.
- Gantt, E. und C.A.Lipschultz (1972). Phycobilisomes of
Porphyridium cruentum. I. Isolation. J. Cell
Biol. 54, 313.
- Glazer, A.N. (1977). Structure and molecular organization
of the photosynthetic accessory pigments of
cyanobacteria and red algae. Mol. Cell Biochem.
18, 125.
- Glazer, A.N. und G.Cohen-Bazire (1971). Subunit structure
of the phycobiliproteins of blue-green algae.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1398.
- Glazer, A.N., G.Cohen-Bazire und R.Y.Stanier (1971).
Comparative immunology of algal biliproteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 3005.
- Glazer, A.N. und S.Fang (1973). Chromophore content of
blue-green algae phycobiliproteins. J. Biol.
Chem. 248, 663.
- Glazer, A.N., C.S.Hixson und R.J.DeLange (1979).
Determination of the number of thioether linked
cysteine residues in cytochromes c and phyco-
biliproteins. Anal. Biochem. 92, 489.
- Glick, R.E. und B.A.Zilinskas (1982). Role of the color-
less polypeptides in phycobilisome reconstitution
from separated phycobiliproteins. Plant Physiol.
69, 991.

- Goedheer, J.C. (1965). Fluorescence action spectra of algae and bean leaves at room and at liquid nitrogen temperatures. *Biochem. Biophys. Acta* 102, 73.
- Grabowski, J. und E.Gantt (1978). Photophysical properties of phycobiliproteins from phycobilisomes: fluorescence lifetimes, quantum yields and polarization spectra. *Photochem. Photobiol.* 28, 39.
- Granick, S. (1961). Magnesium protoporphyrin monoester and protoporphyrin monomethyl ester in chlorophyll biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 236, 1168.
- Gray, B.H., C.A.Lipschultz und E.Gantt (1973). Phycobilisomes from a blue-green alga, *Nostoc* sp. *J. Bacteriol.* 116, 471.
- Grossman, A., S.Bartlett und N.-H.Chua (1980). Energy dependent uptake of cytoplasmically synthesized polypeptides by chloroplasts. *Nature* 285, 625.
- Hampp, R., N.Sankhla und W.Huber (1975). Effect of EMD-IT-5914 on chlorophyll synthesis in leaves of *Pennisetum typhoides* seedlings. *Physiol. Plant.* 33, 53.
- Hattori, A., H.L.Crespi und J.J.Katz (1965). Association and dissociation of phycocyanin and the effect of deuterium substitution on the processes. *Biochemistry* 4, 1225.
- Haxo, F.T. und L.R.Blinks (1950). Photosynthetic action spectra of marine algae. *J. Gen. Physiol.* 33, 389.
- Heidelberger, M. und F.E.Kendall (1935). A quantitative theory of the precipitin reaction. *J. exp. Med.* 62, 697.
- Heil, A. und W.Zillig (1970). Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. *FEBS Letters* 11, 165.

- Heinrich, P.C. (1980). Synthese und Import von Polypeptiden in Mitochondrien. *Biologie in unserer Zeit*, 10. Jahrgang 1980, Nr. 5, 129.
- Jurgenson, J.E., S.J.Beale und R.F.Troxler (1976). Biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in the unicellular rhodophyte *Cyanidium caldarium*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 69, 149.
- Kasemir, H. und H.Mohr (1981). The involvement of phytochrome in controlling chlorophyll and 5-aminolevulinate formation in a gymnosperm seedling (*Pinus silvestris*). *Planta* 152, 369.
- Klein, O. und H.Senger (1978). Biosynthetic pathway to δ -aminolevulinic acid induced by blue light in the pigment mutant C - 2 A' of *Scenedesmus obliquus*. *Photochem. Photobiol.* 27, 203.
- Köst, H.-P. (1974). Strukturuntersuchungen an den Phycobiliproteiden B-Phycoerythrin aus *Porphyridium cruentum* und C-Phycocyanin aus *Anacystis nidulans*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Köst-Reyes, E. und H.-P.Köst (1979). The protein-chromophore bond in B-Phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Eur. J. Biochem.* 102, 83.
- Korb, H. und W.Neupert (1978). Biogenesis of cytochrome c in *Neurospora crassa*. Synthesis of apocytochrome c, transfer to mitochondria and conversion to holo-cytochrome c. *Eur. J. Biochem.* 91, 609.
- Kufer, W. (1980). Untersuchungen zur Protein-Chromophor-Wechselwirkung in Biliproteiden. Reversible Denaturierung und Darstellung und Charakterisierung von Biliproteiden mit chemisch modifizierten Chromophoren. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

- Kufer, W. und H.Scheer (1979). Studies on plant bile pigments. VII. Preparation and characterization of phycobiliproteins with chromophores chemically modified by reduction. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 935.
- Kung, S.D., J.P.Thornber und S.G.Wildman (1972). Nuclear DNA codes for the photosystem II chlorophyll-protein of chloroplast membranes. FEBS Letters 24, 185.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature 227, 680.
- Lagarias, J.C., A.N.Glazer und H.Rapoport (1979). Chromopeptides from C-phycocyanin. Structure and linkage of a phycocyanobilin bound to the B-subunit. J. Am. Chem. Soc. 101, 5030.
- Lascelles, J. und T.Altshuler (1967). Some properties of mutant strains of *Rhodospseudomonas spheroides* which do not form bacteriochlorophyll. Arch. Microbiol. 59, 204.
- Laurell, C.B. (1965). Antigen-antibody crossed electrophoresis. Anal. Biochem. 10, 358.
- Lemberg, R. und G.Bader (1933). Die Phycobiline der Rotalgen. Liebigs Ann. Chem. 505, 151.
- Lundell, D.J., R.C.Williams und A.N.Glazer (1981 a). Molecular architecture of a light-harvesting antenna. In vitro assembly of the rod substructures of *Synechococcus* 6301 phycobilisomes. J. Biol. Chem. 256, 3580.
- Lundell, D.J., G.Yamanaka und A.N.Glazer (1981 b). A terminal energy acceptor of the phycobilisome: the 75000-dalton polypeptide of *Synechococcus* 6301 phycobilisomes - a new biliprotein. J. Cell Biol. 91, 315.

- MacColl, R. (1982). Phycobilisomes and phycobiliproteins. Review. Photochem. Photobiol. 35, 899.
- Machold, O. und O.Aurich (1972). Sites of synthesis of chloroplast lamellar proteins in *Vicia faba*. Biochem. Biophys. Acta 281, 103.
- Mancini, G., A.O.Carbonara und J.F.Heremans (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 2, 235.
- Mirault, M.-E. und K.Scherrer (1971). Isolation of pre-ribosomes from HeLa cells and their characterization by electrophoresis on uniform and exponential-gradient polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 23, 372.
- Mörschel, E., K.-P.Koller, W.Wehrmeyer und H.Schneider (1977). Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea*. I. Electron microscopy of phycobilisomes in situ and analysis of their architecture after isolation and negative staining. Cytobiologie 16, 118.
- Mörschel, E., K.-P.Koller und W.Wehrmeyer (1980). Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea*. Electron microscopical and biochemical analyses of C-phycocyanin and allophycocyanin aggregates. Arch. Microbiol. 125, 43.
- Muckle, G. (1978). Vergleichende Untersuchungen von C-Phycocerythrin aus verschiedenen Cyanobakterien unter besonderer Berücksichtigung der Chromophorregionen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Muckle, G. und W.Rüdiger (1977). Chromophore content of C-Phycocerythrin from various cyanobacteria. Z. Naturforsch. 32 c, 957.

- Nandi, D.L. und D.Shemin (1968). δ -aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodospseudomonas spheroides*. III. Mechanism of porphobilinogen synthesis. *J. Biol. Chem.* 243, 1236.
- Nelson, N. und G.Schatz (1979). Energy dependent processing of cytoplasmically made precursors to mitochondrial proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4365.
- Neuhoff, V. (1981). Die Tüpfelprobe als einfaches Verfahren zur Proteinbestimmung. *Biologie in unserer Zeit*, 11. Jahrgang Nr. 4, 121.
- Nichols, K.E. und L.Bogorad (1962). Action spectra studies of phycocyanin formation in a mutant of *Cyanidium caldarium*. *Bot. Gazette* 124, 85.
- Nies, M. und W.Wehrmeyer (1980). Isolation and biliprotein characterization of phycobilisomes from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* Cohn. *Planta* 150, 330.
- Nies, M. und W.Wehrmeyer (1981). Biliprotein assembly in the hemidiscoidal phycobilisomes of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* Cohn. Characterization of dissociation products with special reference to the peripheral phycoerythrocyanin - phycocyanin complexes. *Arch. Microbiol.* 129, 374.
- O'Carra, P. und C.O'hEocha (1966). Bilins released from algae and biliproteins by methanolic extraction. *Phytochemistry* 5, 993.
- O'Carra, P. und O'hEocha (1976). Algal biliproteins and phycobilins. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, T.W.Goodwin (ed.), Vol. 1, Academic Press London, New York, San Francisco, pp. 328.

- Offner, G.D., A.S.Brown-Mason, M.M.Ehrhardt und R.F. Troxler (1981). Primary structure of phycocyanin from the unicellular rhodophyte *Cyanidium caldarium*. I. Complete amino acid sequence of the α -subunit. *J. Biol. Chem.* 256, 12167.
- O'hEocha, C. (1962). The structure of the phycobilins. AD 292 679 Armed Forces Technical Information Agency, Arlington Hall Station, Arlington, Va., 21.
- Ouchterlony, Ö. (1962). Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. In: *Progress in allergy* 6, 30.
- Peterson, R.B., E.Dolan, H.E.Calvert und B.Ke (1981). Energy transfer from phycobiliproteins to photosystem I in vegetative cells and heterocysts of *Anabaena variabilis*. *Biochem. Biophys. Acta* 634, 237.
- Porra, R.J., E.A.Irving und A.M.Tennick (1972). The detection of δ -aminolaevulinic acid synthetase in anaerobically grown *Torulopsis utilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 149, 563.
- Porter, G., C.J.Tredwell, G.F.W.Searle und J.Barber (1978). Picosecond time resolved energy transfer in *Porphyridium cruentum*. Part I. In the intact alga. *Biochem. Biophys. Acta* 501, 232.
- Radola, B.J. (1980). Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50 - 100 μ m polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1, 43.
- Ramus, J., S.J.Beale, D.Mauzerall und K.L.Howard (1976). Changes in photosynthetic pigment concentration in sea weeds as a function of water depth. *Mar. Biol.* 37, 223.

- Raven, P.H. (1970). A multiple origin for plastids and mitochondria. *Science* 169, 641.
- Redlinger, T.E. und E.Gantt (1981). Polypeptides of *Porphyridium cruentum* phycobilisomes. *Plant Physiol. (Bethesda)* 67, 64.
- Rotte & Co. Ltd. (1980). Phycocyanin as a chewing gum coloring agent. Patent, Japan Kokai Tokkyo Koho.
- Roy, H., B.Terenna und L.C.Cheong (1977). Synthesis of the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by soluble fraction polyribosomes of pea leaves. *Plant Physiol. (Bethesda)* 60, 532.
- Rüdiger, W. (1971). Gallenfarbstoffe und Biliproteide. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 29, 60.
- Rüdiger, W. (1975). Phycobiliproteide. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 88, 125.
- Rüdiger, W. und P.O'Carra (1969). Studies on the structure and apoprotein linkages of the phycobilins. *Eur. J. Biochem.* 7, 509.
- Scheer, H. (1981). Biliproteine. *Angew. Chemie* 93, 230.
- Schmid, R. und A.F.McDonagh (1979). Formation and metabolism of bile pigments in vivo. In: *The Porphyrins*, Vol. VI, D.Dolphin (ed.), Academic Press, New York, pp. 257.
- Schmidt, G.W., S.G.Bartlett, A.R.Grossman, A.R.Cashmore und N.-H.Chua (1981). Biosynthetic pathways of two polypeptide subunits of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex. *J. Cell Biol.* 91, 468.
- Schneider, H. (1980). Chlorophyll biosynthesis. Enzymes and regulation of enzyme activities. In: *Pigments in Plants*, F.-C.Czygan (ed.), 2nd edition, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York, pp. 237.

- Schneider, H.A.W. und L.Bogorad (1979). Spectral response curves for the formation of phycobiliproteins, chlorophyll and δ -aminolevulinic acid in *Cyanidium caldarium*. Z. Pflanzenphysiol. 94, 449.
- Schoch, S. und W.Rüdiger (1976). Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden. IV. Liebigs Ann. Chem., 559.
- Schram, B.L. und H.H.Kroes (1971). Structure of phycocyanobilin. Eur. J. Biochem. 19, 581.
- Searle, G.W.F., J.Barber, G.Porter und C.J.Tredwell (1978). Picosecond time-resolved energy transfer in *Porphyridium cruentum*. Part II. In isolated phycobilisomes. Biochem. Biophys. Acta 501, 246.
- Sepp, E. (1981). Immunochemische Untersuchungen an B-Phycocerythrin. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Shemin, D. (1970). On the synthesis of heme. Naturwiss. 57, 185.
- Shemin, D. und C.S.Russell (1953). δ -aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. J. Am. Chem. Soc. 75, 4873.
- Steinmüller, K., M.Kaling und K.Zetsche (1982). In vitro Synthese von Rhodoplastenproteinen. Kurzfassungen der Vorträge und Poster, Jubiläumstagung Deutsche Botanische Gesellschaft, Nr. 261.
- Tait, G.H. (1972). 5-aminolaevulinate synthetase of *Micrococcus d nitrificans*. Biochem. J. 128, 32 P.
- Tandeau de Marsac, N. und G.Cohen-Bazire (1977). Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1635.
- Tenhunen, R., H.S.Marver und R.Schmid (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 748.

- Tenhunen, R., H.S.Marver und R.Schmid (1969). Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. J. Biol. Chem. 244, 6388.
- Troxler, R.F. (1972). Synthesis of bile pigments in plants. Formation of carbon monoxide and phycocyanobilin in wild-type and mutant strains of the alga, *Cyanidium caldarium*. Biochemistry 11, 4235.
- Troxler, R.F. und R.Lester (1967). Biosynthesis of phycocyanobilin. Biochemistry 6, 3840.
- Troxler, R.F., A.S.Brown und S.B.Brown (1979). Bile pigment synthesis in plants. Mechanism of ^{18}O -incorporation into phycocyanobilin in the unicellular rhodophyte *Cyanidium caldarium*. J. Biol. Chem. 254, 3411.
- Troxler, R.F., M.M.Ehrhardt, A.S.Brown-Mason und G.D.Offner (1981). Primary structure of phycocyanin from the unicellular rhodophyte *Cyanidium caldarium*. II. Complete amino acid sequence of the β -subunit. J. Biol. Chem. 256, 12176.
- Walk, R.A. und B.Hock (1978). Cell-free synthesis of glyoxysomal malate dehydrogenase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 81, 636.
- Walsh, R.G., P.Wingfield, A.N.Glazer und R.J.DeLange (1980). Amino acid sequence of C-phycocyanin, α -subunit, from *Synechococcus* 6301 (*Anacystis nidulans*). Fed. Proc. 39, 1998.
- Wanner, G. und H.-P.Köst (1980). Investigations on the arrangement and fine structure of *Porphyridium cruentum* phycobilisomes. Protoplasma 102, 97.
- Wehrmeyer, W. (1971). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Feinstruktur von *Porphyridium violaceum* Kornmann mit Bemerkungen über seine taxonomische Stellung. Arch. Microbiol. 75, 599.

- Williams, V.P., P.Freidenreich und A.N.Glazer (1974).
Homology of amino-terminal regions of C-phyco-
cyanins from a prokaryote and a eukaryote.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 462.
- Yamanaka, G. und A.N.Glazer (1980). Dynamic aspects of
phycobilisome structure. Phycobilisome turnover
during nitrogen starvation in *Synechococcus* sp.
Arch. Microbiol. 124, 39.
- Yamanaka, G., A.N.Glazer und R.C.Williams (1980).
Molecular architecture of a light-harvesting
antenna. J. Biol. Chem. 255, 11004.
- Yu, M.-H. und A.N.Glazer (1982). Cyanobacterial phyco-
bilisomes. Role of the linker polypeptides in
the assembly of phycocyanin. J. Biol. Chem. 257,
3429.

Lebenslauf

- 1953 geboren in Landshut am 5. Mai
- 1959-1963 Volksschule an der Senftenauerstrasse in München
- 1963-1965 Louise-Schröder-Gymnasium in München
(Neusprachlicher Zweig)
- 1965-1972 Käthe-Kollwitz-Gymnasium in München
(Sozialwissenschaftlicher Zweig)
- 1972 Reifeprüfung im Juni
- 1972 Beginn des Studiums der Biologie und Chemie
an der Universität München
- 1977-1978 Zulassungsarbeit am Institut für organische
Chemie der Universität München
- 1978 1. Staatsexamen in Biologie und Chemie
- 1979 Beginn der Dissertation am Botanischen
Institut der Universität München bei
Prof. Dr. W. Rüdiger

